



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULDADE DE BIOLOXÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA CELULAR

**Alteracións no comportamento depresivo
e na plasticidade neural hipocámpica
no rato heterocigoto *reeler***

TESE DE DOUTORAMENTO

Raquel Romay Tallón

Santiago de Compostela, 2012



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE BIOLOXÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA CELULAR

**Alteracións no comportamento depresivo e
na plasticidade neural hipocámpica
no rato heterocigoto *reeler***

Tese de doutoramento presentada por
Raquel Romay Tallón

Héctor Juan Caruncho Michinel

Prof. Titular de Bioloxía Celular
Dpto. Bioloxía Celular e Ecoloxía

Departamento Bioloxía Celular e Ecoloxía
Facultade de Bioloxía
Universidade de Santiago de Compostela

D. Héctor Juan Caruncho Michinel, Prof. Titular de Bioloxía Celular da
Facultade de Bioloxía da Universidade de Santiago de Compostela,

Fai constar:

Que Dna. Raquel Romay Tallón realizou baixo a miña dirección o
traballo de Tese de Doutoramento, *Alteracións no Comportamento
Depresivo e na Plasticidade Neural Hipocámpica dos Ratos
Heterocigotos Reeler*, e que dito traballo reúne todas as condicións
necesarias para ser presentado para a súa valoración pola comisión
correspondente.

E para que así conste e teña efectos oportunos firmámolo en
Santiago de Compostela a

Asdo. Héctor Juan Caruncho Michinel
Prof. Titular de Bioloxía Celular
Dpto. Bioloxía Celular e Ecoloxía

Raquel Romay Tallón

A Eugenia e a Susi

Índice:

Introdución	21
1.- A FORMACIÓN HIPOCÁMPICA	24
1.1.- ANATOMÍA	25
1.1.1.- XIRO DENTADO	25
Capa molecular	26
Capa granular	27
Capa polimórfica ou <i>hilus</i>	28
1.1.2.- HIPOCAMPO PROPIO	30
Alveus	31
Estrato oriens	31
Capa piramidal	32
Estrato radiado	33
Estrato lacunoso-molecular	34
1.2.- CONEXIÓNS	35
1.2.1.- CIRCUÍTO TRISINÁPTICO CLÁSICO	35
1.2.2.- XIRO DENTADO	40
1.2.2.a.- CONEXIÓNS INTRÍNSECAS	40
Capa granular	40
Capa polimórfica	40
Conexións asociativas e comisurais	40
1.2.2.b.- CONEXIÓNS EXTRÍNSECAS	41
1.2.3.- HIPOCAMPO PROPIO	42

1.2.3.a.- CONEXIÓNS INTRÍNSECAS.....	42
Conexións asociativas e comisurais	42
1.2.3.b.- CONEXIÓNS EXTRÍNSECAS	42
2.- PLASTICIDADE SINÁPTICA NO HIPOCAMPO	43
3.- NEUROXÉNESE NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS ADULTOS.....	49
Neuroxénese e depresión	56
4.- A REELINA	58
Proteína e xene	58
Receptores e cadoiros de sinalización intracelular	60
Papel funcional da reelina	65
5.- O RATO MUTANTE REELER E O RATO HETEROCIGOTO	
<i>REELER</i>	68
6.- A REELINA E AS ENFERMIDADES MENTAIS.....	73
7.- MODELOS ANIMAIS DE DEPRESIÓN	77
Modelos animais de depresión: tratamento prolongado	
con corticosterona.....	82
Xustificación e obxectivos	85
Material e métodos	91
ANIMAIS.....	93
Procedemento do xenotipado	93
1.- GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	96
Grupo experimental 1	96
Grupo experimental 2	97
Grupo experimental 3	98

Grupo experimental 4	99
2.- PROCEDEMENTO	100
Probos de comportamento	100
Métodos histolóxicos.....	102
Inmunohistoquímica.....	103
Estratexias de cuantificación.....	108
Tratamento estatístico.....	112

Capítulo 1. Estudo dos efectos da administración de corticosterona no comportamento dos ratos heterocigotos <i>reeler</i>	115
1.1.- INTRODUCCIÓN.....	117
1.2.- RESULTADOS.....	120
TEST DE NATACIÓN FORZADA	120
TEST DE CAMPO ABERTO	125
PROBA DE PREFERENCIA DE SACAROSA	129
1.3.- DISCUSIÓN	131

Capítulo 2. Estudo dos efectos da administración de corticosterona sobre a neuroxénese e as células reelina positivas.....	137
2.1.- INTRODUCCIÓN.....	139
2.2.- RESULTADOS.....	141
2.3.- DISCUSIÓN	160

Capítulo 3. Coexpresión da reelina e a óxido nítrico sintetase neuronal nos ratos heterocigotos <i>reeler</i>.....	169
3.1.- INTRODUCCIÓN	171
3.2.- RESULTADOS	173
3.3.- DISCUSIÓN	183
 Capítulo 4. Efecto da corticosterona sobre a coexpresión da reelina e da óxido nítrico sintetase neuronal na zona subgranular do xiro dentado.....	189
4.1.- INTRODUCCIÓN	191
4.2.- RESULTADOS	194
4.3.- DISCUSIÓN	205
 Capítulo 5. Marcadores de plasticidade sináptica: posibles alteracións nos ratos heterocigotos <i>reeler</i>	213
5.1.- INTRODUCCIÓN	215
5.2.- RESULTADOS	219
Sinaptofisina	219
VGLUT1	224
VGLUT2	229
VGLUT3	234
5.3.- DISCUSIÓN	242

Conclusiones	247
Bibliografía	255

Abreviaturas

5HT:	serotonina
ACTH:	<i>adrenocorticotropin hormone</i> , hormona adrenocorticotropina
AMPA:	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
ApoER2:	receptor 2 da apolipoproteína E
BDNF:	<i>brain-derived neurotrophic factor</i> , factor neurotrófico derivado de cerebro
BSA:	<i>bovine serum albumin</i> , albúmina bovina
CA:	cornu Ammonis
CCK:	colecistoquinina
Cdk5:	<i>cyclin-dependent kinase 5</i> , quinase dependente de ciclina 5
CE:	córtex entorrinal
CG:	capa granular
CM:	capa molecular
CMD:	capa molecular distal ou externa
CMP:	capa molecular proximal ou interna
CMM:	capa molecular medial
CNR:	<i>cadherin-related neuronal receptors</i> , receptores neuronais relacionados con cadherinas
CORT:	corticosterona
CP:	capa piramidal
CREB:	<i>AMPC response element-binding protein</i> , proteína de unión ao elemento de resposta a AMPc

CRF:	<i>corticotropin releasing factor</i> , factor de liberación de corticotropina
DA:	dopamina
DCX:	dobrecortina
DISC1:	<i>disabled in schizophrenia 1</i>
EGF:	<i>epidermal growth factor</i> , factor de crecimiento epidérmico
EL:	estrado lúcido
ELM:	estrato lacunoso-molecular
EO:	estrato oriens
ER:	estrato radiado
FGF :	<i>fibroblast growth factor</i> , factor de crecimiento de fibroblastos
GAD 67:	<i>glutamic acid decarboxylase 67</i> , ácido glutámico descarboxilase isoforma 67
GC:	guanilil ciclase
GFAP:	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , proteína ácido-fibrilar glial
GLU:	glutamato
GR:	<i>glucocorticoids receptors</i> , receptores de glicocorticoides
HPA:	eixe hipotálamo-pituitario-adrenal
HRM:	<i>heterozygous reeler mice</i> , ratos heterocigotos <i>reeler</i>
IGF-1:	<i>insulin-like growth factor-1</i> , factor de crecimiento semellante á insulina-1
IHQ:	inmunohistoquímica
JIP:	<i>interacting protein</i> , proteína de interacción

JNK:	<i>c-Jun amino(N)-terminal kinase</i> , proteína de interacción coa quinase do extremo amino terminal de c-JUN
LTD:	<i>long term depression</i> , depresión a longo prazo
LTP:	<i>long term potentiation</i> , potenciación a longo prazo
MAO:	monoamino oxidasa
MR:	<i>mineralocorticoids receptors</i> , receptores de mineralocorticoides
NA:	noradrenalina
NaCl:	cloruro sódico ou solución salina
NADPHd:	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase</i> , diaforase fosfato dinucleótido adenina nicotinamida
NGS:	<i>normal goat serum</i> , soro normal de cabra
NMDA:	n-metil-D-aspartato
nNOS:	<i>neuronal Nitric oxide synthase</i> , óxido nítrico sintetase neuronal
NO:	<i>nitric oxide</i> , óxido nítrico
NPY:	neuropéptido Y
PB:	<i>phosphate buffer</i> , tampón fosfato
PFA:	paraformaldehído
PFC:	<i>prefrontal cortex</i> , córtex prefrontal
PKA:	<i>protein kinase A</i> , proteína quinase A dependente de AMPc
PKG:	<i>protein kinase G</i> , proteína quinase G
PSA-NCAM:	<i>polysialic acid neuronal cell adhesion</i> , forma polisializada da molécula de adhesión celular neural
PSD95:	<i>postsynaptic Density 95</i> , proteína de densidade postsináptica 95

PTB:	<i>phosphotyrosine binding domain</i> , dominio de unión de fosfotirosinas
PVN:	<i>paraventricular nucleus</i> , núcleo paraventricular
SERT:	<i>serotonin transporter</i> , transportador de serotonina
SFK:	familia de tirosinas quinases SRC
SGZ:	<i>subgranular zone</i> , zona subgranular
STP:	<i>short term potentiation</i> , plasticidade a curto prazo
SYN:	<i>synaptophysin</i> , sinaptofisina
TH:	tirosina hidroxilase
VEGF:	<i>vascular endothelial growth factor</i> , factor de crescimento endotelial vascular
VGLUT:	<i>vesicular glutamate transporters</i> , transportadores vesiculares de glutamato
VLDL:	<i>very low density lipoprotein</i> , receptores de lipoproteínas de moi baixa densidade
VTa:	<i>ventral tegmental area</i> , área tegmental ventral
WTM:	<i>wild type mice</i> , ratos de xenotipo salvaxe
XD:	xiro dentado

Introducción

Nas próximas páxinas ímonos centrar nunha descrición xeral da formación hipocámpica e as súas funcións, a súa relación coa depresión, a posible validez da utilización de modelos animais para coñecer en máis detalle os mecanismos neurobiolóxicos subxacentes á patoloxía depresiva, e centrarémonos tamén na descrición da proteína reelina e das súas funcións así como as características de ratos deficientes na expresión desta proteína (ao ser estes ratos os animais usados nos experimentos da presente tese). Posteriormente, en cada capítulo de resultados farase unha pequena introdución para revisar de forma breve o que se coñece sobre os aspectos concretos estudados en cada capítulo, e como chegamos a formular as hipóteses específicas a validar nos experimentos de cada un destes capítulos.

1.- A FORMACIÓN HIPOCÁMPICA

A denominación de formación hipocámpica aplícase a un grupo de rexións corticais citoarquitectónicamente distintas, pero colindantes, que inclúe: xiro dentado, hipocampo, subiculum, presubiculum, parasubiculum e córtex entorrinal. A principal razón para incluír estas rexións baixo a mesma nomenclatura é que están conectadas mediante redes neuronais unidireccionais.

A formación hipocámpica é una estrutura alongada que se estende en forma de C pola liña media do cerebro, rostródorsalmente cerca do núcleo septal, e caudoventralmente sobre, e por detrás, do tálamo.

O eixe lonxitudinal da formación hipocámpica refírese como eixe septotemporal, o eixe ortogonal refírese como o eixe transversal. A niveis máis septais son visibles o xiro dentado e o hipocampo propio, a medida que avanzamos cara niveis máis temporais aparecen o subiculum, parasubiculum e presubiculum. A nivel máis caudal e máis ventral aparece o córtex entorrinal.

A descrición xeral do hipocampo que facemos a continuación baséase principalmente nas revisións de Freund e Buzsáki (1996), Johnston e Amaral (2004), e Amaral e Lavenex (2007).

1.1.- ANATOMÍA

1.1.1.- XIRO DENTADO

O xiro dentado (XD) ou *fascia dentata* consta de tres capas (Figura 1):

- A capa máis superficial, que está máis cerca da fisura hipocámpica, é a capa molecular (CM).
- A principal capa celular é a capa granular (CG). Ten forma de U ou de V en función do nivel septotemporal no que nos atopemos.
- Envolta pola capa granular atopamos a terceira capa do xiro dentado, é unha capa celular denominada capa polimórfica ou hilus.

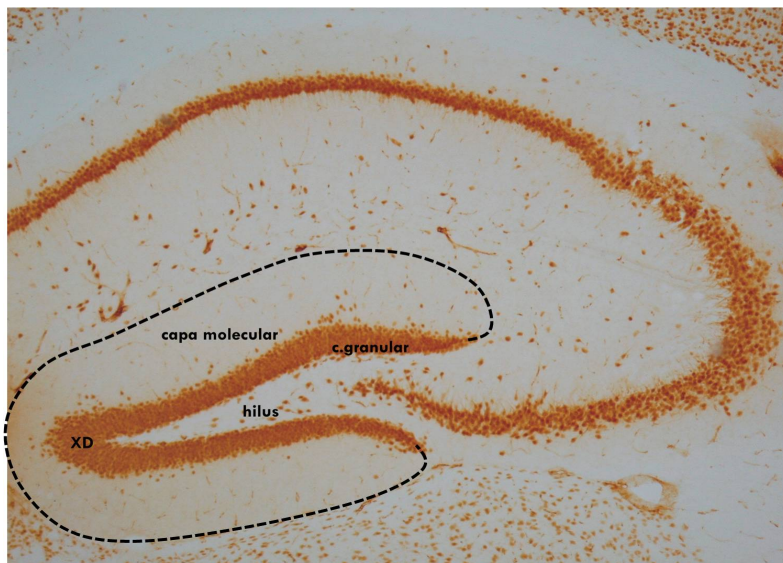


Figura 1: Esquema da organización das capas do xiro dentado.

CAPA MOLECULAR

A capa molecular pódese subdividir en tres zonas: unha capa molecular distal ou externa (CMD), que é a zona máis próxima á fisura hipocámpica, a capa molecular medial (CMM) e a capa molecular proximal ou interna (CMP), que é a capa máis profunda, próxima á capa granular do xiro dentado.

Esta capa é fundamentalmente acelular, está ocupada polas dendritas apicais das células granulares, das células piramidais en cesto localizadas na zona subgranular e células musgosas da capa polimórfica ou *hilus*, ademais de terminacións axónicas procedentes doutras rexións.

Tamén podemos atopar algún tipo celular, como as células asociadas á vía perforante da capa molecular. Son células con corpos triangulares ou multipolares que aparecen na parte externa desta capa; son inmunopositivas para a somatostatina e para o neuropéptido Y (NPY) e tamén para a proteína asociada a Ca^{+2} calretinina. Estas células posúen un axón que ramifícase principalmente na capa molecular externa e media, e ten dendritas sen espiñas que forman arborizacións dentro da propia capa molecular.

Outro tipo celular desta capa son as células axo-axónicas ou células en candelabro que aparecen situadas inmediatamente adxacentes á capa granular. As súas dendritas esténdense na capa molecular, mentres que o seu axón descende ata a capa granular onde se ramifica e establece contactos sinápticos simétricos cos segmentos proximais dos axóns das células granulares. As dendritas poderían recibir aferencias

procedentes do córtex entorrinal a través da vía perforante. Estas células son GABAérxicas e inmunopositivas para a parvalbúmina, e podería supoñer un control inhibitorio sobre as células granulares.

Nesta capa tamén están as interneuronas que están especializadas en establecer contacto con outras interneuronas.

CAPA GRANULAR

Trátase dunha capa celular, sendo o seu principal compoñente as células granulares. Son células de natureza glutamatérxica con forma elíptica. As súas dendritas son espiñosas e ramifícanse na capa molecular ata alcanzar a fisura hipocámpica ou a superficie ventricular. Os seus axóns son coñecidos como fibras musgosas porque forman botóns sinápticos xigantes característicos. Son os únicos que deixan o xiro dentado para establecer conexións coas dendritas apicais das células piramidais do hipocampo propio.

Na parte máis profunda desta capa coñecida como zona subgranular (*Subgranular zone, SGZ*), están as células piramidais en cesto e son células GABAérxicas. O seu axón forma un plexo que rodea os somas das células granulares e establece contactos sinápticos simétricos con eles. Posúen unha dendrita apical sen espiñas que se estende e ramifica na capa molecular, e unha dendrita basal que se prolonga polo *hilus*. Algunhas destas células piramidais en cesto expresan a proteína de unión a Ca^{+2} parvalbúmina así como os neuropéptidos

colecistoquinina (CCK), NPY, o péptido vasoactivo intestinal (*Vasoactive intestinal peptide*, VIP) ou a somatostatina.

Nesta zona subgranular tamén existen outras interneuronas GABAérxicas que mostran diferentes morfoloxías e distribución tanto dendrítica como axonal. Algunhas son multipolares con dendritas sen espiñas que se ramifican pola capa molecular e polimórfica. Outras con morfoloxía fusiforme que presentan unha distribución dendrítica semellante. Parece que estas interneuronas contribúen coas células piramidais en cesto a formar o plexo na capa granular e establecen contactos sinápticos cos somas celulares, coas dendritas proximais e ocasionalmente cos segmentos iniciais dos axóns.

CAPA POLIMÓRFICA OU *HILUS*

O principal tipo neuronal desta capa son as células musgosas. Estas células son glutamatérxicas e teñen forma triangular ou multipolar. Tres ou máis dendritas espiñosas saen do soma e dan lugar a ramificacións que alcanzan a capa granular e a capa molecular, pero nunca saen do xiro dentado.

As fibras musgosas contactan coas dendritas das células musgosas mediante terminais sinápticas moi características, chamadas excrecencias espiñosas (*thorny excrescences*). Son protuberancias multilobuladas que se forman cando a expansión presináptica forma un

botón que envolve as espiñas dendríticas postsinápticas (Otal Agudo, 2003).

Os axóns das células musgosas alcanzan a capa molecular interna, onde establecen contactos sinápticos asimétricos coas dendritas das células granulares. Así mesmo, son a principal fonte excitatoria das proxeccións asociativas e comisurais do xiro dentado, razón pola cal non se corresponden exactamente coa descrición de interneurona.

Nesta capa tamén podemos atopar un tipo particular de células fusiformes chamadas células asociadas á vía perforante hilar. Estas células presentan dúas ou tres dendritas espiñosas principais que se prolongan ao longo da capa granular e caracterízanse por expresar somatostatina, NPY, e tamén calretinina. Teñen axóns que chegan ata os terzos externo e medial da capa molecular, onde establecen sinapses inhibitorias sobre as dendritas das células granulares. Ademais, este plexo axonal esténdese ao longo do eixe septotemporal do xiro dentado.

Atopamos tamén, células multipolares chamadas células relacionadas coa vía asociativa e comisural hilar. Estas células posúen dendritas sen espiñas que se estenden polo longo do *hilus* e da capa molecular. Os axóns esténdense ata a capa molecular interna. Tamén se caracterizan por ser inmunopositivas para a proteína de unión a Ca^{+2} calretinina.

1.1.2.- HIPOCAMPO PROPIO

O hipocampo propio (Figura 2) é unha estrutura cortical laminada que consta de:

- A capa piramidal (CP) formada polas células piramidais. Lorente de Nó (1934) subdividiuna en función do empacamento, morfoloxía e conectividade das súas células. Así, a rexión máis distal ao xiro dentado sería a CA1 (Cornu Ammonis 1), mentres que a rexión proximal se divide en CA2 e CA3.
- Por debaixo desta capa piramidal existe unha capa practicamente acelular que sería o estrato oriens (EO).
- Profunda ao estrato oriens está unha fina capa de fibras chamada alveus.
- Só na CA3, sobre as células piramidais aparece unha capa delgada, o estrato lúcido (EL), onde as fibras musgosas das células granulares do xiro dentado establecen contacto coas dendritas das células piramidais.
- Superficial ao estrato lúcido, no caso da CA3, e ao estrato piramidal na CA2 e CA1 aparece o estrato radiado (ER).
- A capa máis superficial do hipocampo propio é o estrato lacunoso-molecular (ELM).

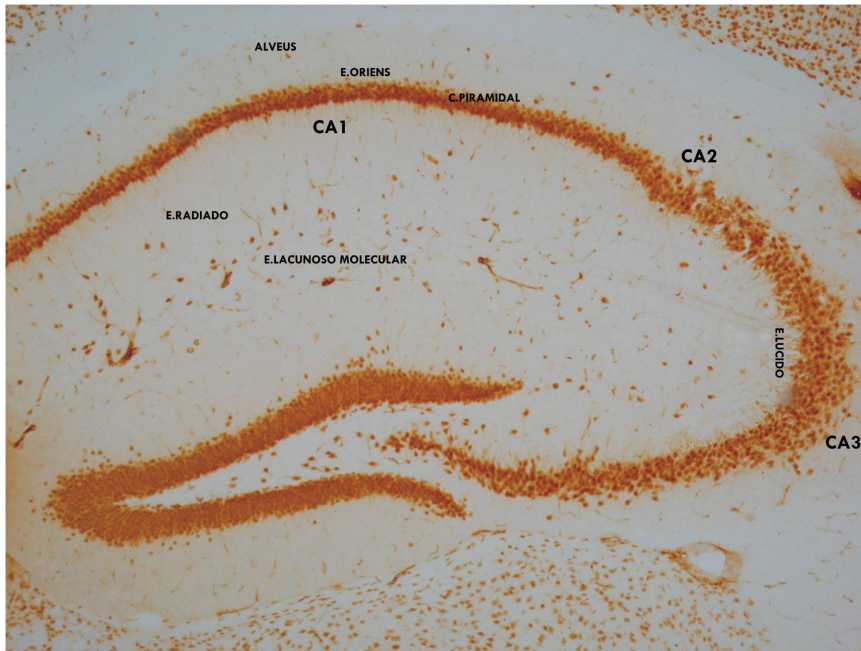


Figura 2: Esquema representativo das capas do hipocampo propio.

ALVEUS

É a capa máis profunda do hipocampo. Aínda que nela se sitúan algunhas interneuronas GABAérxicas, basicamente está composta por fibras.

ESTRATO ORIENS

Sitúase superficial ao alveus e está formado polas dendritas basais e os axóns das células piramidais. Atopamos tamén un tipo celular denominado células asociadas ao estrato lacunoso-molecular e oriens, que posúen unha densa arborización axonal que está no ELM,

establecendo conexión coas aferencias procedentes do córtex entorrinal e coas dendritas apicais das células piramidais. Estas interneuronas expresan NPY e somatostatina e calbindina. Tamén podemos atopar as interneuronas trilaminares e horizontais que envían colaterais axonais no eixe transversal, caracterízanse por expresar calbindina.

CAPA PIRAMIDAL

O principal tipo celular desta capa son as células piramidais. Son células glutamatérxicas, que posúen unha árbore dendrítica basal que se estende no estrato oriens e dendritas apicais que se estenden no estrato radiado.

As células piramidais da CA1 son moi homoxéneas en canto á lonxitude e complexidade das súas dendritas. Soen ter unha dendrita apical ou dúas, cando teñen unha soa dendrita apical o tamaño das dendritas basais é lixeiramente maior que cando teñen dúas dendritas apicais.

As células piramidais da CA3 son máis heteroxéneas, o seu tamaño é superior ás situadas na CA1 e a lonxitude das súas dendritas depende de se a súa posición é máis ou menos distal ao xiro dentado.

Na capa piramidal podemos atopar moitos tipos de interneuronas. Un dos máis importantes son as células piramidais en cesto, que están situadas cerca ou dentro da capa piramidal. A morfoloxía destas células é moi variable, existen células en cesto

fusiformes no estrato oriens e con forma de estrela no estrato radiado. En todos os casos, os axóns destas neuronas inervan o soma e as dendritas proximais das células piramidais. As súas dendritas esténdense no estrato oriens, radiado e ata lacunoso-molecular. Estas dendritas poden ter ou non espiñas e reciben sinapses tanto excitatorias como inhibitorias. Moitas das conexións excitatorias proceden das células piramidais. Ao igual que ocorre coas células piramidais en cesto situadas no xiro dentado, estas tamén expresan CCK, VIP e parvalbúmina.

ESTRATO RADIADO

Este estrato está ocupado, principalmente, polas longas dendritas apicais das células piramidais. Tamén se poden atopar interneuronas GABAérxicas como son as células axo-axónicas ou candelabro que están situadas adxacentes á capa piramidal, caracterízanse por ser inmunopositivas para a parvalbúmina. Os axóns destas células discorren superficiais a dita capa e dan lugar a colaterais que entran na mesma para establecer contactos cos axóns proximais das células piramidais. Tamén adxacentes á capa piramidal atopamos as células biestratificadas que teñen dendritas multipolares, pero non alcanzan o estrato lacunoso-molecular. Caracterízanse por ser calbindina positivas. O axón destas células esténdese en áreas máis profundas do estrato radiado, alcanzando o estrato oriens e establece contactos coas dendritas das

células piramidais. Tamén se atopan as células trilaminares radiais, as súas dendritas e o axón ramifícanse formando un plexo limitado á CP e establecen conexións coas dendritas das células piramidais. Tanto as células biestratificadas como as trilaminares expresan calbindina.

ESTRATO LACUNOSO-MOLECULAR

É o estrato máis superficial do hipocampo e é o máis próximo á fisura hipocámpica. É nesta zona onde a vía perforante, procedente do córtex entorrinal, contacta coas dendritas das células piramidais e das interneuronas.

Nesta capa atopamos diversos tipos de interneuronas como as interneuronas do estrato lacunoso-molecular, que son aquelas que atopamos no límite entre o estrato radiado e o lacunoso-molecular. As súas dendritas e axón esténdense horizontalmente no mesmo estrato e ramifícanse alcanzando a parte distal do estrato radiado e incluso a capa piramidal. Expresan calbindina así como somatostatina e NPY

Finalmente atopamos un tipo de interneurona que tamén xa fora descrito no xiro dentado, as neuronas IS. Estas interneuronas están situadas en todas as capas e establecen contactos sinápticos tan só con outras interneuronas. Son positivas a calbindina.

1.2.- CONEXIÓNS

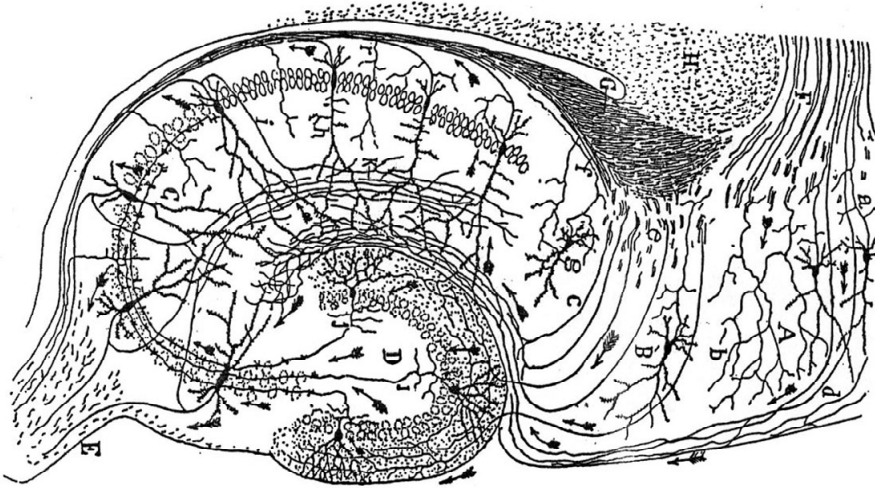


Figura 3: Esquema das conexións do hipocampo debuxadas por Ramón y Cajal (1911).

A circuitería básica da formación hipocámpica xa foi estudada por Ramón y Cajal (1911) (Figura 3), aínda que algúns detalles foron modificados posteriormente (Para revisión ver Witter e Amaral, 2004; Johnston e Amaral, 2004).

1.2.1.- CIRCUÍTO TRISINÁPTICO CLÁSICO

O circuito trisináptico clásico supón a principal vía de entrada de conexións do hipocampo (Figura 4).

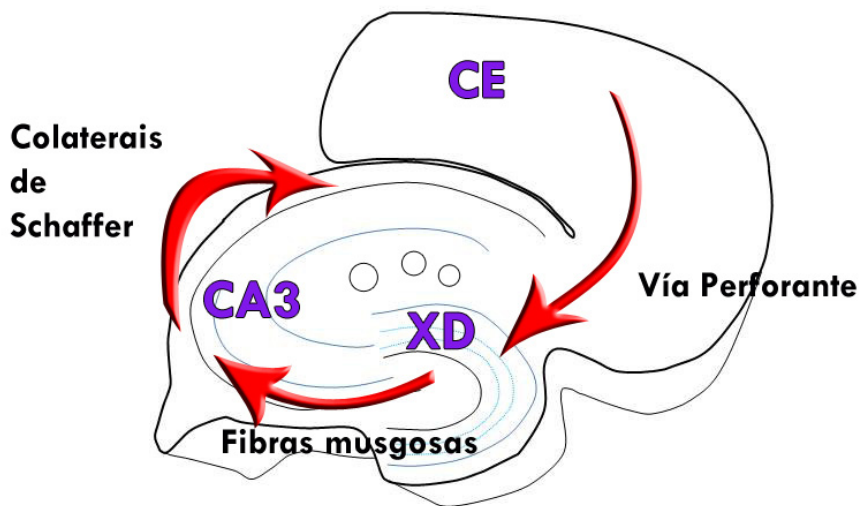


Figura 4: Representación esquemática co circuito trisináptico clásico. CE: córtex entorrinal; XD: xiro dentado.

Vía perforante

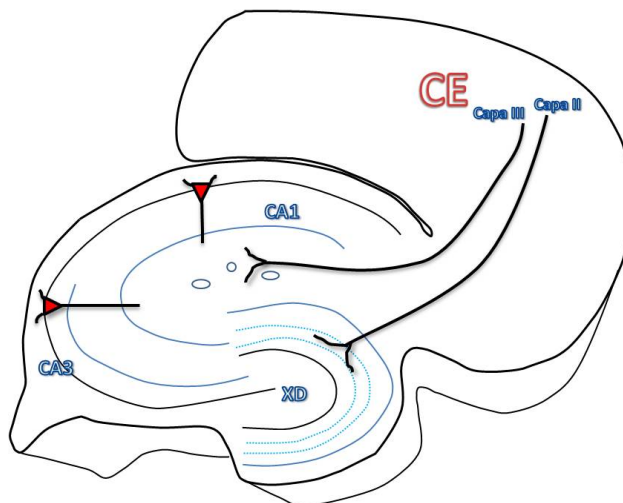


Figura 5: Esquema da vía perforante.

O córtex entorrinal (CE) supón a principal entrada de información ao xiro dentado a través da vía perforante (Figura 5). Esta rexión supón a principal entrada de información sensorial na formación hipocámpica. Denomínase así debido á súa traxectoria cara o hipocampo a través da substancia branca, o feixe angular, a capa de células piramidais do subiculum e a fisura hipocampal (Otal Agudo, 2003).

As proxeccións dende o córtex entorrinal ao xiro dentado parten dende a capa II mentres que no caso do hipocampo propio as fibras da vía perforante parten principalmente da capa III.

Fibras musgosas

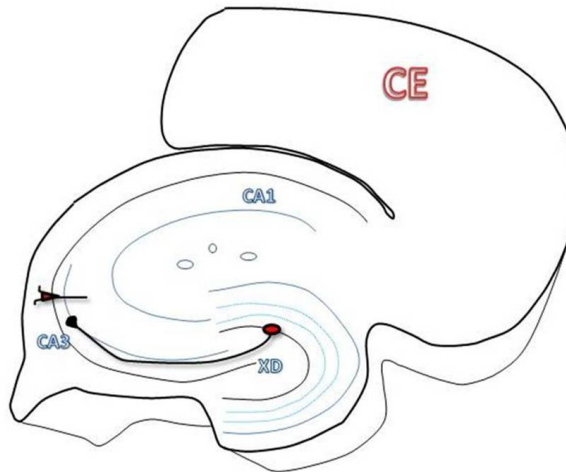


Figura 6: Representación das conexións establecidas polas fibras musgosas.

O xiro dentado só proxecta á CA3 do hipocampo propio, a través das fibras musgosas que son os axóns amielínicos das células granulares

(Figura 6). As fibras musgosas contactan coas dendritas apicais das neuronas piramidais da CA3 e coas células musgosas do hilus a través dun botón sináptico de características especiais. As células granulares proxectan a CA3 e establecen contactos nunha estreita rexión sobre a capa piramidal, o estrato lúcido. Trátase dun botón sináptico de grande tamaño que pódese formar ao final do axón ou ao longo do percorrido formando contactos en *passant*. Estes complexos contactos sinápticos son expansións da terminal presináptica que forma un botón que envolve a terminal postsináptica, esta forma unhas protuberancias multilobuladas chamadas *thorny excrescences*. Outra característica das conexións das fibras musgosas coas neuronas piramidais da CA3 é que os contactos entre as membranas presináptica e postsináptica faise a través dunhas densidades simétricas chamadas *puncta adhaerentia*. Cada un destes complexos teñen múltiples zonas de contactos de feito chegaron a detectarse máis de 35 contactos nun único complexo sináptico nunha dendrita (Otal Agudo, 2003).

Colaterais de Schaffer

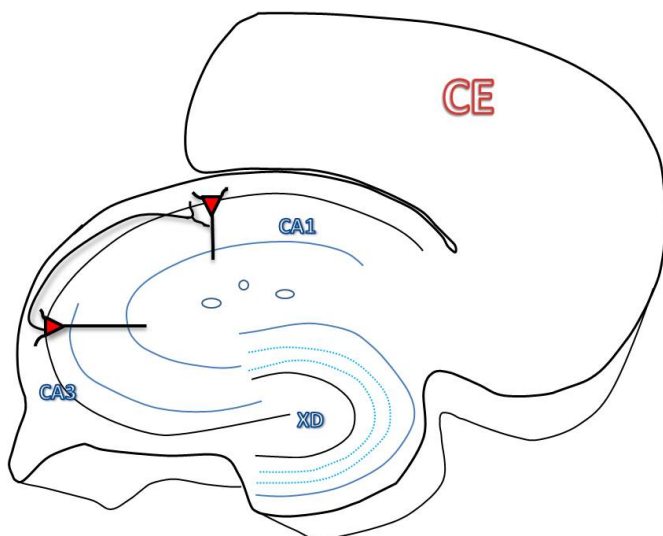


Figura 7: Esquema representativo das colaterais de Schaffer.

Os axóns das células piramidais de todas as porcións da CA3 conectan coas células piramidais da CA1, chámanse colaterais de Schaffer (Figura 7). Establecen conexións coas dendritas apicais das células piramidais no estrato radiado e coas dendritas basais no estrato oriens, ao longo do eixe septotemporal.

1.2.2.- XIRO DENTADO

1.2.2.a.- CONEXIÓNS INTRÍNSECAS

CAPA GRANULAR

As células granulares reciben un control inhibitorio por parte das células piramidais en cesto localizadas na zona subgranular, así como outras interneuronas como as células en candelabro da capa molecular.

CAPA POLIMÓRFICA

Os axóns das células granulares posúen botóns especialmente grandes que forman contactos *en passant* coas células musgosas ata alcanzar as células piramidais da CA3. Cada fibra musgosa dá lugar a colaterais que á súa vez se ramifican formando un extenso plexo axonal na capa polimórfica. Estas ramificacións establecen contactos coas células musgosas, sobre as dendritas proximais.

CONEXIÓNS ASOCIATIVAS E COMISURAS

O terzo interior da capa molecular recibe as proxeccións orixinadas ipsi e contralateralmente da capa polimórfica, ou as proxeccións asociativas e comisurais, respectivamente. A maioría dos axóns que participan nestas proxeccións proceden das células musgosas,

que son glutamatérxicas. Considérase que estas vías son excitatorias, establecendo sinapses asimétricas sobre as dendritas das células granulares.

A organización das proxeccións comisurais é semellante ás asociativas.

As proxeccións das células musgosas localizadas nun determinado nivel septotemporal distribúense amplamente a outros niveis septais e temporais, e á súa vez reciben conexións por parte das células granulares a través das fibras musgosas, polo que, esta sería unha vía pola que as células musgosas transmitirían as saídas das células granulares a outros niveis distantes no xiro dentado.

As conexións asociativas tamén contactan coas células en cesto, que á súa vez están inervando as células granulares. Deste xeito, a vía asociativa sería unha vía excitatoria actuando sobre as células granulares distantes, e tamén unha vía inhibitoria empregando as células en cesto como intermediarias.

1.2.2.b.- CONEXIÓNS EXTRÍNSECAS

O xiro dentado recibe non só recibe conexións procedentes do córtex entorrinal, senón tamén doutras áreas como: o núcleo septal, o cal envía terminais de natureza colinérxica; o hipotálamo; o *locus coeruleus* e área tegmental ventral do cal parten conexións noradrenérxica e dopaminérxica respectivamente.

1.2.3.- HIPOCAMPO PROPIO

1.2.3.a.- CONEXIÓNS INTRÍNSECAS

CONEXIÓNS ASOCIATIVAS E COMISURAIS

A vía asociativa conecta neuronas piramidais da CA3 coas súas homólogas ipsilaterais. Unha particularidade desta vía é que as células situadas na CA3 proximal respecto ao xiro dentado só inervan outras células situadas a nivel proximal e adxacentes, mentres que as situadas a nivel medial e distal proxectan a toda a lonxitude septotemporal e transversal.

A vía comisural conecta as células piramidais da CA3 coas células piramidais da CA1, CA2 e CA3 do hipocampo contralateral, así como tamén con interneuronas. A distribución destas conexións é igual cá descrita para as asociativas.

1.2.3.b.- CONEXIÓNS EXTRÍNSECAS

O hipocampo recibe outras conexión extrínsecas procedentes de: neocórtex, amígdala, hipotálamo e tálamo; *locus coeruleus*.

2.- PLASTICIDADE SINÁPTICA NO HIPOCAMPO

As conexións sinápticas son plásticas, entre unha neurona presináptica e unha neurona postsináptica poden facilitarse ou diminuírse dependendo da actividade sináptica previa. Estas alteracións poden durar dende segundos, horas ata meses ou máis. As modificacións na eficacia sináptica implica cambios no número e na estrutura das sinapses, e considérase que representa o substrato da aprendizaxe e da memoria (Malenka e Siegelbaum, 2001).

O hipocampo é unha área moi plástica, implicada na memoria declarativa ou explícita, é dicir, na memoria dos eventos ou na memoria consciente. Supón un lugar de almacenamento temporal para a información (Squire e Kandel, 1999). Nos roedores, que teñen un sistema nervioso adaptado a moverse por ambientes complexos, o hipocampo supón unha estrutura importante para a memoria espacial, así como para os olores.

Existen diferentes formas de plasticidade en función da súa duración, polo que podemos ter plasticidade a curto e a longo prazo.

Dentro da plasticidade a curto prazo (*Short term potentiation, STP*), podemos falar de procesos de potenciación ou de depresión das conexións sinápticas que duran a penas uns minutos.

Cando se trata dos cambios na plasticidade sináptica a longo prazo tamén se pode tratar tanto dunha potenciación das conexións sinápticas, como dunha depresión das mesmas. Denomínanse

potenciación a longo prazo (*Long term potentiation*, LTP) e depresión a longo prazo (*Long term depression*, LTD).

A depresión a longo prazo, a miúdo ocorre pola chegada durante varios minutos dun estímulo de baixa frecuencia nunha vía sináptica. (Johnston e Amaral, 2004).

A LTP pode producirse por un tren de estímulos de alta frecuencia sobre unha espiña dendrítica. Con este tren de estímulos de alta frecuencia prodúcese unha entrada de Ca^{+2} a través dos receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) (Matsuzaki, 2007) esta entrada de Ca^{+2} produce o desbloqueo dos receptores n-metil-D-aspartato (NMDA) incrementando as correntes de entrada a través deles. Estas correntes de Ca^{+2} producen a activación de moléculas efectoras que promoven a activación doutros receptores NMDA e o recrutamento de receptores AMPA cara a membrana postsináptica, é dicir, activación de sinapses silentes (Popoli, 2002; Barco e cols., 2006). De feito parece que non sería só un efecto postsináptico senón que tamén tería lugar a activación de proteínas que estimulan a liberación de neurotransmisores, polo que a LTP produce unha activación de sinapses mudas e de sinapses xordas (Popoli, 2002).

Durante a fase tardía da LTP ten lugar a expresión de xenes e síntese proteica que trasládanse ata as sinapses activas, as cales están marcadas a nivel postsináptico pola presenza da proteína quinase A dependente de AMPc (*Protein kinase*, PKA) e na membrana presináptica

polo factor neurotrófico derivado de cerebro (*Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) (Kandel, 2001)

A potenciación das conexións sinápticas manteríase mediante mensaxeiros retrógrados como o óxido nítrico ou o ácido araquidónico, que estimularían proteínas quinases cuxos substratos estimularían a liberación de neurotransmisores. O BDNF tamén participaría no mantemento (Malenka e Bear, 2004).

A LTP pode ter lugar en calquera das vías sinápticas do hipocampo. As fibras musgosas, establecen conexións coas dendritas proximais das neuronas piramidais da CA3, liberan glutamato (GLU) que tanto se vai unir a receptores NMDA como non NMDA (Squire e Kandel, 1999). Esta LTP presenta características importantes:

- Cooperatividade.
- Asociatividade.
- Especificidade de entrada.

A cooperatividade fai referencia a que son necesarios varios axóns activados ao mesmo tempo, liberando GLU sobre unha terminal postsináptica.

A asociatividade refírese a que é necesaria unha actividade conxunta da terminal presináptica e postsináptica. É dicir, para iniciar a entrada de Ca^{+2} na neurona postsináptica é necesaria unha aferencia presináptica de suficiente potencia.

A especificidade de entrada implica que o efecto da LTP en terminais dendríticas adxacentes é distinto se o potencial de acción provén de distintos axóns (Andersen e cols., 2007).

A LTP considérase a ferramenta para o almacenamento de memoria e aprendizaxe. O volume das espiñas dendríticas é proporcional ao número de receptores AMPA presentes nelas (Matsuzaki, 2007) e así mesmo a entrada de Ca^{+2} na terminal promove un cambio na estrutura das espiñas dendríticas, este feito implica que as de menor tamaño se estimularían pola aprendizaxe e as de maior tamaño, máis estables e con maior condutancia, estarían implicadas na memoria. Así mesmo, o tamaño das dendritas varía de forma continua inducida polos cambios debidos á actividade, este feito sustentaría o modelo en cadoiro da memoria, que clasifica a memoria en varios estadios (Matsuzaki, 2007).

Diversos estudos apuntan que estes procesos de plasticidade sináptica están alterados en pacientes con depresión e outros trastornos do humor, así como enfermidades mentais como a esquizofrenia ou o trastorno bipolar. O hipocampo é unha das áreas máis afectadas nos pacientes que presentan estas doenzas (Harrison e Eastwood, 2001; Harrison, 2004; McDonald e cols., 2006). Coñécese que proteínas implicadas nas conexións sinápticas e nos procesos de plasticidade, como a sinaptofisina, están alteradas no hipocampo destes pacientes (Chambers e cols., 2004). A sinaptofisina (*Synaptophysin*, SYN) aparece

expresada na membrana das vesículas sinápticas de todas as terminais presinápticas, é o marcador de plasticidade sináptica máis amplamente empregado para estudar as posibles alteracións nas conexións sinápticas (Tao-Cheng, 2006; Wang e cols., 2007).

Para estudar os sistemas de neurotransmisión glutamatérxico e GABAérxico tamén existen proteínas que resultan marcadores adecuado. No caso concreto do sistema glutamatérxico os transportadores vesiculares de glutamato son os máis amplamente empregados como marcadores (*Vesicular glutamate transporters*, VGLUTs). Estes transportadores presentan tres isoformas: VGLUT1 e 2 e máis recentemente descubriuse o VGLUT3 (Gras e cols., 2002). O VGLUT1 e o 2 aparecen en vesículas sinápticas das terminais presinápticas glutamatérxicas e presentan un patrón de distribución que non se solapa ao longo do sistema nervioso central (Fremeau e cols., 2001). O VGLUT3 presenta a particularidade de que non só aparece expresado nas terminais presinápticas glutamatérxicas senón tamén en terminais postsinápticas e ademais aparece expresado en terminais GABAérxicas, colinérxicas e serotoninérxicas así como no soma dalgunhas interneuronas GABAérxicas (Gras e cols., 2002; Liguz-Leczna e Skangiel-Kramska, 2007). A análise destes marcadores do sistema glutamatérxico revelaron que os pacientes con esquizofrenia presentan unha redución na expresión do VGLUT1 o cal está moi amplamente distribuído en zonas corticais como o hipocampo (Harrison, 2004).

Así mesmo, o sometemento a unha situación de estrés crónico comporta un incremento de glicocorticoides, o que supón un factor de vulnerabilidade fronte a depresión, xa que estes elevados niveis de glicocorticoides causan unha menor expresión de elementos fundamentais para os procesos sinápticos, como o BDNF. A consecuencia desta alteración é unha menor plasticidade sináptica e neural, o que supón parte importante da base neurobiolóxica destas doenzas psiquiátricas (Dwivedi, 2009). Con este incremento de glicocorticoides tamén se ve un incremento na óxido nítrico sintetase neuronal (*neuronal Nitric oxide synthase*, nNOS). Este encima encárgase da síntese de óxido nítrico (*Nitric oxide*, NO), o cal participa na modulación da plasticidade sináptica e promove procesos de LTP, actuando en conxunción cos receptores NMDA (Szabadits e cols., 2011). Algúns estudos apuntan evidencias de que un incremento na expresión da nNOS podería estar detrás das alteracións no comportamento observadas cando se realizan tests a animais que foron sometidos a un estrés crónico previo (Zhou e cols., 2007).

Estas alteracións observadas na depresión e na esquizofrenia, poderían resultar nun déficit na capacidade de aprendizaxe e memoria observados nestes pacientes. Trataríase dun desequilibrio entre a ocorrencia da LTP e a da LTD. Habería unha prevalencia da LTD sobre a LTP, probablemente debido a unha sobreestimulación da transmisión sináptica, o que implicaría a alteración da capacidade para dar unha

resposta adecuada ante unha situación de estrés e da capacidade de toma de decisións.

3.- NEUROXÉNESE NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS ADULTOS

A neuroxénese é definida como o conxunto de pasos do desenvolvemento que levan dende a división dunha célula nai ou proxenitora a unha neurona madura e funcionalmente integrada (Kempermann e cols., 2002).

Implica a proliferación, adquisición do fenotipo neuronal, maduración morfolóxica e fisiolóxica e desenvolvemento de características neuronais funcionais. A neuroxénese ten lugar principalmente en dúas áreas cerebrais: a zona subventricular, de onde parten células cara o bulbo olfactivo onde se diferenciarán en interneuronas, e a zona subgranular do xiro dentado, de onde parten células que se diferenciarán en células granulares. Estes nichos neuroxénicos están compostos por neuronas, oligodendrocitos e astrocitos, que aportan factores que regulan o destino final glial ou neuronal das células proxenitoras (Ming e cols., 2005; Zhao e cols., 2008a).

A neuroxénese desenvólvese en varios estadios que se poden caracterizar pola expresión de diferentes proteínas e factores de transcripción:

O primeiro estadio, o estadio de proliferación parte de células proxenitoras neurais, ou tipo I ou tipo B. Teñen características de glía radial, teñen un soma triangular e presentan prolongacións radiais que se estenden pola capa granular. Nesta etapa expresan:

- a proteína ácido-fibrilar glial (*Glial fibrillary acidic protein*, GFAP).

- a proteína de unión a filamentos intermedios, nestina.

- Ademais expresan factores de transcripción como o HMG box ou o PAX6. Este último tamén xoga un papel importante na determinación do destino neuronal das células proxenitoras.

No segundo e terceiro estadio, o estadio de diferenciación e migración, partimos de células proxenitoras intermedias tipo II/III ou D. Neste estadio teñen o soma redondeado e teñen as prolongacións máis curtas orientadas tanxencialmente. Deixan de expresar GFAP e expresan nestina, as células que expresan esta proteína diferéncianse especificamente en neuronas (von Bohlen e Halbach, 2007). e o factor de transcripción Sox-2 e o TBR-2, ademais de que seguen expresando PAX6. Tardiamente, neste estado deixan de expresar nestina e comezan a expresar:

- Dobrecortina (DCX), unha proteína de unión a microtúbulos, que promove a unión dos mesmos e parece que xoga un papel importante na migración celular.

- A forma polisializada da molécula de adhesión celular neural (*Polysialic acid neural cell adhesion*, PSA-NCAM), a cal parece que podería actuar promovendo a sinaptoxénese e a remodelación sináptica dependente de actividade.

- E o factor de transcripción de diferenciación neural (NeuroD) que actuaría como determinante do destino neural.

As novas neuronas da SGZ migran unha curta distancia cara a capa granular. Unha proteína que controla esta migración é a DISC1 (*disabled in schizophrenia 1*), así como a reelina. Alteracións nestas proteínas supoñen que as novas neuronas ocupen posicións ectópicas. Ao final deste estadio comezan a migrar cara a capa granular e teñen características morfolóxicas e electrofisiolóxicas de neuronas inmaturas (Hevner e cols., 2006; von Bohlen e Halbach, 2007; Balu e Lucki, 2008).

No cuarto estadio, o estadio de maduración, as neuronas inmaturas deseguido alcanzan a capa granular e comezan a desenvolver as prolongacións que se estenden ata os seus lugares diana. Entre os 4-10 días, as dendritas alcanzan a capa molecular e os axóns a capa piramidal da CA3, aínda que seguen medrando e adquirindo complexidade. As neuronas vólvense postmitóticas e comezan a expresar:

- NeuN, que é unha proteína soluble nuclear localizada no núcleo e no citoplasma.

- A proteína de unión a Ca^{+2} , calretinina.

- É o factor de transcripción Tbr-1, específico de neuronas postmitóticas.

Durante a maduración reciben entradas funcionais GABAérxicas, que tamén funcionan como excitatorias, pero non glutamatérxicas. Estas conexións GABAérxicas promoverían a diferenciación neuronal (Hevner e cols., 2006; von Bohlen e Halbach, 2007; Balu e Lucki, 2008; Zhao e cols., 2008a).

No quinto estadio, integración sináptica, ás 2-4 semanas as novas neuronas establecen contactos sinápticos co córtex entorrinal e coas células piramidais da CA3. Neste punto intercambian calretinina por calbindina, que se coexpresa con NeuN, e que aparece nas células granulares e nas piramidais este intercambio correlaciónase coa sinaptoxénese no hipocampo, agora as conexións glutamatérxicas xa son funcionais. Tamén comezan a formarse as espiñas dendríticas mentres as dendritas seguen medrando.

As neuronas inmaturas teñen propiedades de membrana distintas das neuronas maduras. Teñen un menor albor de condutancia de Ca^{+2} , co cal unha pequena corrente de entrada pode disparar un potencial de acción, o que implica facilidade para a indución dunha LTP ou LTD. A amplitude desta LTP incrementase na semana 6-7, onde as neuronas xa están incluídas nos circuitos normais do xiro dentado.

Parece que a supervivencia destas neuronas vén regulada polos receptores NMDA, polo que estaría relacionada coa experiencia como a aprendizaxe ou a exposición a un ambiente enriquecedor. A morte celular ocorre rapidamente despois de se volver postmitóticas (Ming e cols., 2005; von Bohlen e Halbach, 2007; Balu e Lucki, 2008; Zhao e cols., 2008a).

Este proceso de neuroxénese está regulado por moitos factores intrínsecos e extrínsecos, que actúan nos diferentes estadios anteriormente descritos. O ambiente que rodea ás células proxenitoras regulan a súa proliferación e a determinación da súa liñaxe, mediante conexións mediadas por unións *gap* a través de conexinas. As efrinas, que son moléculas de superficie celular, regulan a migración destas neuronas inmaturas, así como a sinaptoxénese, mediante a actuación a través dos seus receptores EphB. Factores de crecemento e neurotróficos, como o factor de crecemento de fibroblastos-2 (*Fibroblast growth factor-2*, FGF-2) ou o BDNF, actúan promovendo a neuroxénese.

As conexións que reciben estas neuronas procedentes da vía perforante e procedentes doutras áreas cerebrais, tamén regulan a supervivencia e diferenciación das mesmas. O GLU é moi importante para a regulación da neuroxénese, promóvea ou inhíbea en función dos receptores a través dos que actúa: a unión aos receptores NMDA restrinxe a neuroxénese mentres que a unión aos receptores AMPA promóvea (Balu e Lucki, 2008). O GABA actúa sobre as células proxenitoras a través do receptor GABA-A, promove a diferenciación

neuronal e é fundamental para a integración sináptica das neuronas acabadas de formar. Os neurotransmisores monoaminérxicos actúan promovendo, ou inhibindo, a neuroxénese nos distintos estadios, dependendo do receptor ao que se unan (Balu e Lucki, 2008). A nNOS actúa sobre a neuroxénese inhibíndoa parece que por unha vía que involucra os receptores NMDA. A nNOS actúa como antimitótica e participa na maduración e integración das novas neuronas nos circuitos sinápticos (Mataderrona e cols., 2005).

Existen outros factores extrínsecos que actúan positivamente sobre a neuroxénese, por exemplo, a exposición a un ambiente enriquecedor ou o exercicio físico voluntario, e especúlase que sería a través de factores como o factor de crecemento vascular endotelial. A aprendizaxe dependente do hipocampo tamén a incrementa, ademais de inducir unha LTP, coa consecuente mellora da memoria. De feito, parece que a relación entre memoria e neuroxénese é bidireccional (Ming e cols., 2005).

As novas neuronas insértanse estratexicamente na rede neuronal, co cal a hipótese é que, se ben non engaden memoria, optimizan as novas funcións e niveis de complexidade adquiridos. O hipocampo non é unha área de almacenamento de memoria a longo prazo, procesa a información antes de ser almacenada nas súas zonas correspondentes e implica un pescozo de botella no procesamento da información. É dicir, as terminais que chegan pola vía perforante non establecen contactos con todas as células granulares e estas, á súa vez, non establecen

contactos con todas as células piramidais da CA3. Pode considerarse que a neuroxénese estimulada por un ambiente enriquecedor non sería en resposta a un estímulo concreto, senón que implica un axuste a longo prazo das conexións hipocampais para unha maior capacidade de procesamento de niveis máis complexos de información (Kempermann, 2002).

Unha forma semicuantativa de estudar a neuroxénese no hipocampo é empregando a morfoloxía e arborización das células que expresan DCX. Plümpe e cols. (2006) estableceron unha serie de 6 categorías segundo o grao de desenvolvemento destas células, permitindo así, clasificar as células que se están formando de novo e ver cal é a morfoloxía predominante. (Figura 8).

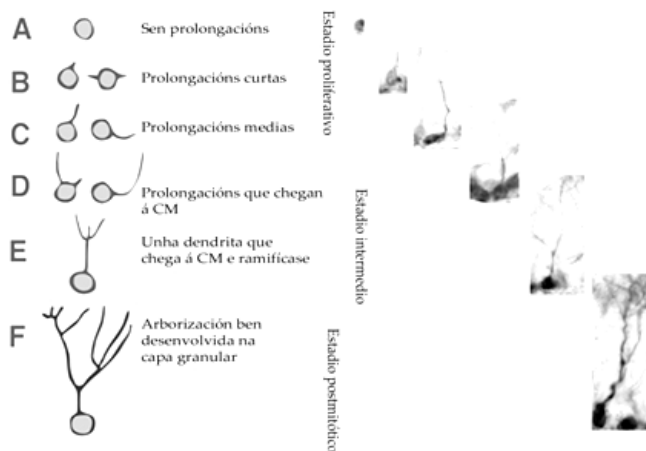


Figura 8: Esquema representativo da categorización das células DCX positivas empregada para unha análise semicuantativa da neuroxénese (modificado de Plümpe e cols., 2006).

NEUROXÉNESE E DEPRESIÓN

Oposto a estes efectos positivos anteriormente mencionados sobre a neuroxénese aparece o estrés. Este efecto negativo vén dado pola activación do eixe hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Incrementase a liberación de GLU, e polo tanto, a activación dos receptores NMDA, reducindo así a neuroxénese. Como consecuencia da sobreactuación deste eixe hai un incremento dos esteroides adrenais, a corticosterona (CORT), que vai asociado a unha maior actividade da nNOS, e polo tanto, un incremento do NO. O NO xoga un papel importante na morfoxénese e sinaptoxénese, e en procesos cognitivos relacionados co hipocampo que están alterados na depresión. Con elevados niveis de CORT, a resultante maior expresión de nNOS causa un efecto negativo sobre a proliferación hipocámpal (Paizanis e cols., 2007; Zhou e cols., 2007). O estrés e a depresión tamén involucran a activación do sistema inmune inflamatorio, especialmente citoquinas de sinalización inmune, como a interleuquina 1 β . Os proxenitores neurais expresan receptores para esta interleuquina que se une a eles causando apoptose, excitotoxicidade e estrés oxidativo.

Unha das consecuencias máis importantes das situacións de estrés crónico é a redución da expresión de factores neurotróficos, de forma especial do BDNF. Isto leva parello unha redución da neuroxénese, que afecta non só a nivel de proliferación senón tamén a nivel de diferenciación e maduración, implicando un menor número de novas neuronas e un peor desenvolvemento da arborización dendrítica

das superviventes (Warner-Schmidt e Duman, 2006). Parece claro que a alteración á baixa da neuroxénese supón unha base neurobiolóxica clave en trastornos mentais, de forma especial na depresión pero tamén na esquizofrenia, onde se ve unha clara atrofia da anatomía hipocámpica así como das neuronas corticais. Aínda así na depresión non se detectaron alteracións morfolóxicas tan graves como noutras doenzas como a esquizofrenia onde si se puido ver unha redución no volume hipocámpica. Isto podería indicar que a neuroxénese deficiente vista na depresión podería ser un factor prodrómico en trastornos máis graves como a esquizofrenia (DeCarolis e cols., 2010).

O hipocampo xoga un papel moi importante na aprendizaxe e na memoria e a alteración na neuroxénese podería explicar os déficits nestes procesos detectados nestes pacientes, así como os diversos déficits cognitivos e de comportamento (Balu e Lucki, 2008; Zhao e cols., 2008a; Dwivedi, 2009). A meirande parte dos tratamentos antidepressivos potencian a neuroxénese incrementando a expresión dos factores neurotróficos e regulando os sistemas de neurotransmisores implicados (Paizanis e cols., 2006).

4.- A REELINA

PROTEÍNA E XENE

A reelina é unha proteína que se segrega á matriz extracelular como unha longa glicoproteína de 3461 aminoácidos e 388 kDa, aproximadamente (Figura 9). Presenta unha rexión N-terminal cun péptido sinal seguido dunha rexión de 500 aminoácidos semellante á proteína F-espondina. Nesta rexión presenta tamén un epítopo chamado CR-50. A esta rexión séguenlle 8 repeticións que abranguen entre 300 e 350 aminoácidos cada unha delas. Cada repetición está formada por un dominio A e un dominio B, que aparecen separados por unha rexión de 30 aminoácidos rica en cisteínas que é un factor de crecemento epidérmico (*Epidermal growth factor*, EGF). Parece que esta rexión mediaría a unión da proteína ao seu receptor. Finalmente presenta un extremo C-terminal que contén 33 aminoácidos básicos, necesarios para a secreción da proteína (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998; Jossin e cols., 2003).

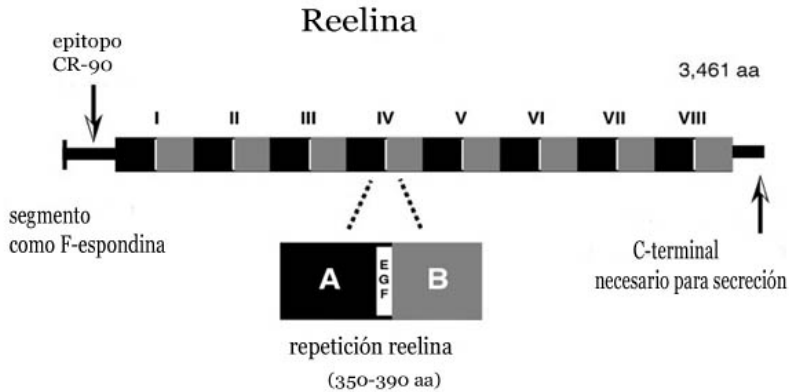


Figura 9: Esquema da proteína reelina (Modificado de Rice e Curran, 2001).

Cando se segrega, esta proteína sométese a un procesamento de proteólise que a divide en tres fragmentos menores. Un fragmento que abarca o extremo N-terminal e as repeticións 1 e 2, de aproximadamente 180 kDa. Un fragmento de 120kDa que comprendía as repeticións 3 a 6. E finalmente un fragmento de 100 kDa correspondente ás repeticións 7 e 8. Non obstante, cando se usa un anticorpo contra o extremo N-terminal, detéctase un produto de peso intermedio, 300 kDa (D'Arcangelo, 2006). Esta proteólise inhíbese usando quelantes de cinc, polo que se supón que unha metaloproteínase estaría implicada no proceso (Tissir e Goffinet, 2003). Parece que o fragmento central que abrangue as repeticións 3 a 6 sería suficiente para desencadear todo o cadoiro de transdución de sinal. Non obstante, parece que a máxima funcionalidade está concentrada na rexión CR-50, quizais porque facilita o agrupamento dos receptores da

proteína, o que implica que o sinal sobre a célula diana é máis forte (Förster e cols., 2006; D'Arcangelo, 2006).

A secuencia do ADNc foi descrita por D'Arcangelo (1995). O xene que codifica a reelina consta de 65 exóns que abranguen 450kb. Este gran tamaño pode deberse á presenza de grandes intróns. Dos 65 exóns, o exón 1 é o codón de iniciación da transcrición. Ademais, codifica a información para o péptido sinal e unha parte do dominio semellante á F-espondina. A restante información para este dominio e para o epitopo CR-50 está nos exóns 1 a 12 e parte do exón 13. Cada unha das oito repeticións presentes na proteína codifícanse entre 5 e 7 exóns. Os dous últimos exóns son microexóns, tan só abranguen 6 pares de bases e un exón terminal que codifica un extremo 3' terminal rico en arxininas (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998).

O xene que codifica esta proteína foi identificado primeiramente en rato, no cromosoma 5, e posteriormente identificouse tamén nos humanos no cromosoma 7. A proteína que este xene humano codifica é un 94% semellante á proteína murina, o que suxire que posúe unha función altamente conservada (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998; Förster e cols., 2006; D'Arcangelo, 2006).

RECEPTORES E CADOIROS DE SINALIZACIÓN INTRACELULAR

A reelina é sintetizada entre o día 13 e 14 do desenvolvemento embrionario, principalmente polas células Cajal-Retzius, na zona

marxinal cortical, e polas células granulares cerebelares. O número de células Cajal-Retzius diminúe ao longo do desenvolvemento, non obstante, a expresión de reelina mantense, sendo expresada maiormente, por interneuronas GABAérxicas do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998; Herz e Chen, 2006; Tueting e cols., 2006).

Esta proteína únese aos receptores de lipoproteínas de moi baixa densidade (*Very low density lipoprotein*, VLDL) e o receptor 2 da apolipoproteína E (ApoER2). Únese simultaneamente aos dous receptores causando o seu agrupamento. Estes están situados en densidades postsinápticas das espiñas dendríticas e dos axóns das neuronas de áreas como o hipocampo ou o córtex. A agregación dos receptores é necesaria para a posterior transdución do sinal (Jossin e cols., 2003; Niu e cols. 2004; Qui e cols., 2006a).

Cando a reelina se une aos seus receptores ponse en funcionamento o cadoiro de sinalización intracelular (Figura 10). Neste momento a proteína *disabled 1* (DAB1) únese nunha secuencia NPxY do extremo intracelular dos receptores ApoER2 e VLDL. Esta unión causa a fosforilación de DAB1 no dominio de unión de fosfotirosinas (*Phosphotyrosine binding domain*, PTB), mediante diversas proteínas quinases, como a familia de tirosinas quinases SRC (SFK). Esta fosforilación permite a unión doutras quinases como a Fyn ou Ab1 (Rice e Curran, 2001). A DAB1 fosforilada incrementa a súa actividade e é capaz de se unir a outras proteínas activando diversas vías de

sinalización. Unha destas vías é a activada pola fosforilación da subunidade p85 da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), fosforilando a proteína quinase B (PKB/Akt). Esta vía leva á inhibición da glicóxeno sintetase quinase 3 β (GSK3 β), esta quinase encárgase de fosforilar a proteína Tau, inhibindo así, a súa actividade promotora da estabilidade dos microtúbulos e facilitando a migración neuronal. A reelina inflúe na dinámica do citoesqueleto celular mediante outras vías, como a da quinase dependente de ciclina 5 (*Cyclin-dependent kinase 5*, Cdk5). Así mesmo, tamén comporta o recrutamento do complexo lisencefalia 1 (LIS1), a cal tamén actúa en paralelo coa Cdk5 regulando a ensamblaxe dos microtúbulos. Outra vía pola que a reelina regula o citoesqueleto é interactuando coa proteína Nck β , o que leva á desorganización do citoesqueleto de actina, implicado no movemento celular e na guía axonal. Tamén desta maneira a reelina actuaría regulando a migración neuronal durante o desenvolvemento así como durante a vida adulta (Won e cols., 2006; Förster e cols., 2006; Herz e cols., 2006; Qiu e cols. 2006a).

Ambos receptores, VLDL e ApoER2, teñen funcións semellantes e é necesaria a unión da reelina a ambos para activar todos os cadoiros de sinalización intracelular. Non obstante, diversos estudos demostraron que o ApoER2 está máis implicado en procesos de plasticidade sináptica. Este receptor pode sufrir un corte e empalme alternativo no exón 19. Este exón codifica unha secuencia aminoacídica que media a interacción do receptor coa proteína de densidade postsináptica 95

(*Postsynaptic Density* 95, PSD95) e coa proteína de interacción (*Interacting proteins*, JIP) coa quinase do extremo amino terminal de c-JUN (*c-Jun amino(N)-terminal kinase*, JNK). Os receptores NMDA están asociados ás densidades postsinápticas con esta proteína (Qiu e cols., 2006a; Herz e cols., 2006). A unión de reelina aos receptores involucra a activación das quinases da familia Src, que ademais das rutas anteriormente mencionadas, fosforilan os receptores NMDA en residuos tirosina no extremo C-terminal das subunidades NR2B e/ou NR2A. Estes receptores están fosforilados a nivel basal por quinases de serinas/treoninas, PKC e PKA, pero con esta fosforilación dependente de reelina incrementárase o fluxo de entrada de Ca^{2+} . A consecuencia deste incremento sería a activación da CAMKII, as PKA e PKC, a adenilato ciclase (AC) e a fosfolipase C, coa conseguinte fosforilación dos receptores NMDA e AMPA, contribuíndo á plasticidade sináptica (Qiu e cols., 2006a; Herz e Chen, 2006; Tueting e cols., 2006). Ademais, a reelina participa no proceso de maduración dos receptores NMDA propiciando o intercambio de subunidades NR2B, presentes durante o desenvolvemento neuronal, polas NR2A.

Ademais dos receptores de lipoproteínas viuse que a reelina tamén se pode unir a outro tipo de receptores como os receptores neuronais relacionados con cadherinas (*Cadherin-related neuronal receptors*, CNR). Estes receptores teñen un dominio extracelular moi semellante ao das cadherinas e poderían mediar a interacción entre células (Rice e Curran, 2001; Jossin e cols., 2003). A reelina únese ás

integrinas compostas polas subunidades $\alpha 3$ e $\beta 1$. Viuse que a reelina e as integrinas colocalizan nas espiñas dendríticas e nas densidades postsinápticas do córtex de primates (Rodríguez e cols., 2000). Estas integrinas están involucradas na migración neuronal, controlando a unión entre as neuronas e a glía radial (Förster e cols., 2006). Viuse que mutacións nas subunidades $\alpha 3$ causa déficits na memoria espacial suxerindo un papel na LTP, xa que participan na formación sináptica, así como na súa estabilización e maduración (Qiu e cols., 2006a).

A unión da reelina coas integrinas pode incrementar a síntese da proteína de citoesqueleto regulada por actividade (Arc), a cal regula a unión neurona-glía finalizando a migración neuronal. A unión da reelina a estes correceptores implica a activación de quinases da familia Src coa conseguinte activación de vías de transdución de sinal como a da proteína Crk, que activa unha cadea de factores de intercambio de guaninas, como Dock1 ou C3G, e pequenas GTPases como Rap1 ou Rac1. A acción final desta vía é unha regulación da migración neuronal, en concreto unha supresión da mesma (Förster e cols., 2006; Qiu e cols., 2006a). Esta vía tamén se activa pola unión da reelina ós seus receptores de lipoproteínas.

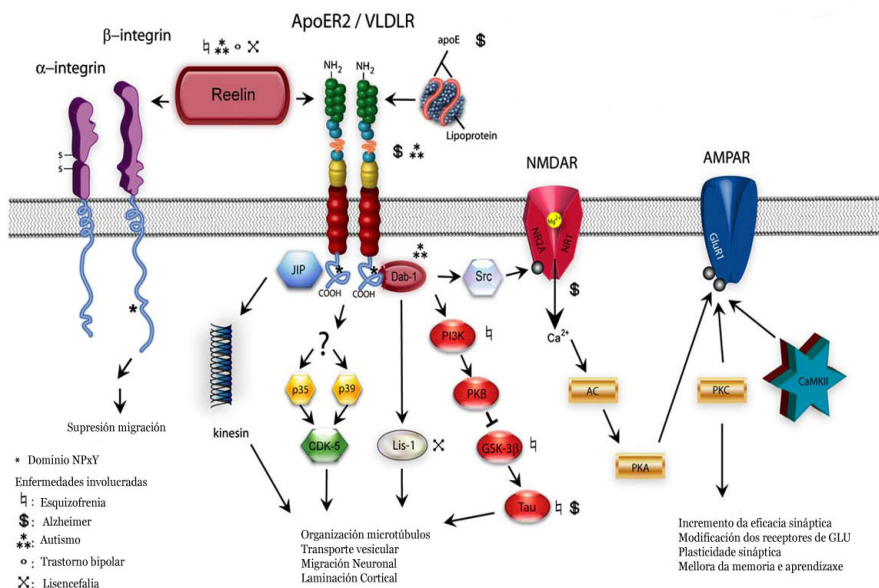


Figura 10: Receptores e cadoiros de sinalización intracelular activados pola reelina (Modificado de Qiu e cols., 2006a).

PAPEL FUNCIONAL DA REELINA

Hai certa controversia respecto aos papeis funcionais da reelina.

Durante o desenvolvemento, esta proteína é sintetizada polas células Cajal-Retzius situadas na capa marxinal e durante a vida adulta é sintetizada polas interneuronas GABAérxicas do córtex cerebral, hipocampo e células granulares glutamatérxicas do cerebelo (Pesold e cols., 1998).

Durante o desenvolvemento, o neocórtex orixínase a partir dunha capa fina de células postmitóticas, esta capa chámase preplaca e

contén un tipo primitivo neuronal que son as células Cajal-Retzius. Nun desenvolvemento normal esta capa divídese en dúas: a subplaca por un lado e zona marxinal por outro. As Cajal-Retzius están na capa marxinal e dende alí sintetizan reelina que actuaría como un quimioatránte para as neuronas postmitóticas, que se van colocando na súa posición correcta e formando as capas do córtex de dentro a fóra. Non obstante, cando non hai reelina, como ocorre nalgúns mutantes, estas novas neuronas non poden atravesar esta preplaca e quedarían acumuladas debaixo. Estas células postmitóticas seguen unha migración radial, é dicir, seguen as prolongacións da glía radial para chegar ao lugar de destino no córtex. A reelina actuaría de quimioatránte sobre a glía radial e sobre as células postmitóticas que migran (Gilmore e Herrup, 2000). Aínda que non é excluínste co anteriormente mencionado, propúxose que a reelina durante o desenvolvemento participaría na escisión da preplaca para a posterior formación da placa cortical e da subplaca, e a correcta localización das mesmas (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998; Herz e Chen, 2006).

Tamén se postulou que podería actuar como un sinal de parada para as células en migración. A reelina sintetizada polas Cajal-Retzius evita que as células da capa cortical cheguen ata a capa marxinal. As células que migran fano seguindo a glía radial e, en ausencia de reelina, estas células invaden a capa marxinal e, ademais, permanecen unidas á glía radial. Propúxose que actuaría como sinal de parada inhibindo a nucleocinese. Tal como se viu no desenvolvemento no cerebelo, nos E14

fórmase unha zona marxinal, entre a capa de células de Purkinje e a capa granular externa. A reelina encargaríase de evitar que as células de Purkinje invadan esta zona marxinal e que se organicen correctamente nunha capa. Non obstante, en diversos estudos viuse que a expresión na zona ventricular non paraliza prematuramente a migración das neuronas tal como se podería esperar (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998; Förster e cols., 2006).

Outro papel funcional presuposto para a reelina é que exerce a súa función actuando sobre as células da capa cortical favorecendo que se separen da glía radial. A reelina decrece a adhesión tanto entre as neuronas como entre as neuronas e as células da glía. Cando non hai reelina, a adhesión celular aumenta, de tal forma que as neuronas tenden a se unir entre si, o que provoca que aparezan desorganizadas. Viuse que a reelina no seu cadoiro de sinalización intracelular propicia a fosforilación de proteínas, como o Nck β , que actúan desorganizando o citoesqueleto de actina (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998; Förster e cols., 2006).

Durante o período postnatal a reelina segue expresándose en zonas como o hipocampo onde promove a neuroxénese así como a correcta migración, localización e desenvolvemento das dendritas de neuronas formadas de novo durante a vida adulta (Niu e cols., 2004; Pujadas e cols., 2010). Nesta zona, ademais, a reelina tamén estaría involucrada en procesos como a plasticidade sináptica ou a potenciación a longo prazo dependente de receptores NMDA. Para algúns autores,

este feito explicaría o mantemento da expresión durante a vida adulta desta proteína (Förster e cols., 2006; Herz e Chen, 2006; Yabut e cols., 2007).

5.- O RATO MUTANTE REELER E O RATO HETEROCIGOTO REELER

En 1948 en Edimburgo apareceu por primeira vez a mutación *reeler* (Falconer, 1956). Esta mutación foi transferida aos laboratorios Jackson (Bar Harbor, USA). Esta primeira mutación consiste nunha delección de 150 kb, que elimina o extremo 3' do xene, causando que non chegue a sintetizarse o ARN mensaxeiro. Esta mutación volveu aparecer en 1969 en Orléans-la-Source e foi transferida ó instituto Pasteur (París, Francia). Neste caso, consiste nunha inserción de 7kb de lonxitude no exón 61, o que supón unha alteración da pauta de lectura e unha terminación prematura. A proteína resultante está alterada posto que carece do extremo C-terminal polo que aparece expresada de forma normal nas células de Cajal-Retzius pero non se secreta á matriz extracelular.

Durante o desenvolvemento do sistema nervioso central, as células que se van formando vanse situando seguindo un patrón de dentro a fóra. A formación das neuronas corticais e a organización en seis capas comeza no día embrionario 10 (E10) ata o E18. Nos ratos

mutantes *reeler* observáronse anomalías na organización de áreas laminadas do sistema nervioso central, tales como o córtex, o hipocampo ou o cerebelo. Mostra anomalías na locomoción caracterizadas por tremores, ataxias (D’Arcangelo, 2006). Nestas zonas o número de neuronas vese que é o correcto e os primeiros pasos do desenvolvemento do sistema nervioso ocorren con normalidade, fórmase a preplaca con neuronas que migran dende a zona ventricular, non obstante, a preplaca non se divide en zona marxinal, capa cortical e subplaca, senón que queda formando unha superplaca na que as neuronas están desorganizadas (Figura 11).

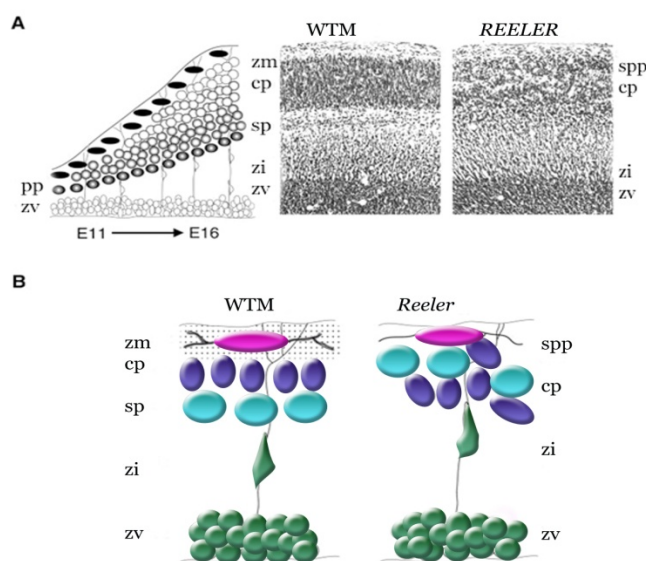


Figura 11: Esquema da organización das capas das áreas laminadas e a desorganización das mesmas presente no rato mutante *reeler* respecto aos ratos de xenotipo salvaxe (Wild type mice, WTM) (Modificado de Rice e Curran, 2001).

Nestes ratos o patrón de desenvolvemento non é o normal de dentro a fóra, senón que as neuronas que se forman de novo están situadas nas capas inferiores e son incapaces de sobrepasar as neuronas formadas primeiramente. Nestes mutantes tamén se observou que as neuronas piramidais do córtex están mal orientadas de tal xeito que algunhas aparecen horizontalmente. Ademais, o axón emerxe do polo apical ou dende a dendrita apical antes de descender cara a materia branca (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998). Nestes mutantes observouse un desenvolvemento anormal das fibras da glía radial posto que aparecen despregadas formando ángulos. Estas fibras empréganas como guía as neuronas para migrar. Outra proposta alternativa é que esta mutación altere as interaccións entre as neuronas, provocando que se formen agregados (Rice e Curran, 2001). Tamén se observaron anomalías noutras áreas cerebrais tales como o bulbo raquídeo, o mesencéfalo e a medula espiñal (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998).

Tamén se verían afectados procesos que ocorren posteriormente á migración neuronal como a maduración e o desenvolvemento de dendritas e a sinaptoxénese (D’Arcangelo, 2006). Non obstante, as aferencias aos córtex visual, somatosensorial, olfativo e motor teñen lugar sobre as células diana correctas, a pesar da súa posición ectópica. As proxeccións talamocorticais teñen lugar nas capas corticais profundas e no rato mutante *reeler*, as proxeccións axonais soben ata as capas superiores para logo xirar e volver baixar seguindo a súa ruta normal. Este patrón correcto non se observou noutras áreas como o cerebelo,

hipocampo ou córtex piriforme, onde existen alteracións na densidade, distribución e topoloxía sináptica (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998; Rice e Curran, 2001).

Ademais da desorganización observada nas áreas laminadas, demostrouse que tamén mostran unha redución do volume cerebral en xeral, así como de áreas en particular como o hipocampo, o cerebelo, os bulbos olfactivos ou o córtex cerebral. A morfoloxía destas áreas aparece alterada respecto aos ratos de xenotipo salvaxe. Tamén se observa un incremento do volume dos ventrículos. No hipocampo pódese observar que a capa piramidal da CA1 e CA3 é máis fina que nos ratos salvaxes, e o xiro dentado mostra unha capa molecular e granular máis finas nos mutantes *reeler* (Badea e cols., 2007).

Estas mutacións naturais replicáronse mediante a administración de clorambucil, producindo dous tipos de mutacións, a chamada Albany1 e Albany2. A primeira caracterízase por unha redución dos niveis de ARN mensaxeiro, pero non se coñece exactamente cal é a orixe desta redución. O mutante Albany2 mostra unha inserción de 5kb no exón 37, co cal al térase a pauta de lectura e a transcrición non se pode completar correctamente dando lugar a un ARN mensaxeiro inestable (Lambert de Rouvroit e Goffinet, 1998).

En ratas tamén se observou este tipo de mutación, por exemplo a rata Shaking Kawasaki, onde non se observou expresión de reelina no córtex acabado de se formar. Tamén cabe mencionar a mutación Creeping, que mostra características típicas do mutante *reeler*, as capas

do córtex aparecen desorganizadas. Non obstante, non se sabe se a mutación é o xene *reeler*.

En humanos o xene que codifica a proteína reelina está situado no cromosoma 7 e unha delección do mesmo desemboca en lisencefalia que é unha redución das circunvolucións, así como unha hipoplasia cerebelar coa consecuente ataxia. Ademais estes pacientes mostran retraso cognitivo e epilepsia (D'Arcangelo, 2006).

Unha redución máis sutil de reelina, entre un 60% e un 40% podemos atopala no rato heterocigoto *reeler* (*Heterozygous reeler mice*, HRM). Non se observan cambios tan drásticos como os detectados nos mutantes *reeler*, como a desorganización cortical ou a ataxia. Non obstante, si se detectan alteracións biolóxicas e anatómicas tales como, unha redución no número de células que expresan reelina e unha redución no neuropilo e no número de espiñas dendríticas. Tamén presentan un lixeiro incremento no volume dos ventrículos laterais (Costa e cols., 2002; Tueting e cols., 2006). Presentan leves alteracións na migración neuronal, coa presenza dun elevado número de células na materia branca cortical. Atopamos alteracións a nivel de neurotransmisión, como unha redución da expresión do encima ácido glutámico descarboxilase (*Glutamic acid decarboxylase*, GAD) na isoforma 67. O sistema glutamatérxico tamén aparece alterado xa que viuse unha sobreexpresión das subunidades NR2A e NR2B dos receptores de glutamato, NMDA (Qiu e cols., 2006b; Isosaka e cols., 2006).

6.- A REELINA E AS ENFERMIDADES MENTAIS

Nas últimas décadas, diversos estudos demostraron que en pacientes con esquizofrenia ou trastorno bipolar existe unha redución do 50% na expresión de reelina en áreas como o cerebelo, hipocampo ou córtex prefrontal (Impagnatiello e cols., 1998). Posteriormente foise vendo que non só se detectaba en pacientes con psicose, senón que noutro tipo de trastornos psiquiátricos como o autismo, o trastorno bipolar non psicótico ou a depresión maior podíaase atopar unha redución de reelina no hipocampo. A menor expresión desta podería estar asociada non só coa vulnerabilidade para a psicose, senón tamén coa disfunción cognitiva que é un síntoma que aparece nestes trastornos psiquiátricos (Fatemi, 2001).

Durante a ontoxenia do cerebro humano, ao igual que ocorre nos ratos, a reelina é expresada polas células de Cajal-Retzius e, durante a vida adulta, comeza a ser expresada por interneuronas GABAérxicas, que a segregan á matriz extracelular. Nos pacientes con enfermidades psicóticas viuse reducida a poboación de células de Cajal-Retzius no córtex prefrontal (Impagnatiello e cols., 1998). Así mesmo, diversos estudos viron que existe unha correlación entre a menor expresión de reelina e a GAD₆₇, polo que se especula que pode ser a causa da aparición dos procesos psicóticos, dado que esta redución é menor en pacientes con depresión unipolar (Guidotti e cols., 2000). Estas neuronas que segregan reelina e GABA poderían contribuír a modular o patrón de

disparo das neuronas piramidais. A reelina únese aos seus receptores situados nas densidades postsinápticas regulando a plasticidade sináptica e a síntese proteica. A menor expresión de reelina polas interneuronas pode ser a causa dunha redución na densidade de espiñas sinápticas, observada en pacientes con esquizofrenia, ou da hipoplasia do neuropilo cortical (Guidotti e cols., 2000; Costa e cols., 2002; Veldic e cols., 2004). Diversos estudos viron que a reelina e a GAD₆₇, colocalizan coa dimetil transferase 1 (DNMT1), un encima que engade grupos metilo nos aneis de citosina e guania, CpG, das rexións promotoras de ADN. A unión dun grupo metilo a esta rexión inhibe a súa expresión xénica. Nestes estudos viuse un incremento da expresión da DNMT1, o que causaría unha hipermetilación do promotor da reelina e da GAD₆₇, levando a súa menor expresión (Veldic e cols., 2004).

En pacientes con estas enfermidades psiquiátricas podemos atopar outras características neuroanatómicas, como un incremento no volume dos ventrículos e un incremento no empaquetamento celular (Guidotti e cols., 2000; Fatemi, 2001; Costa e cols., 2002). Moitas das características descritas nestes pacientes con enfermidades psiquiátricas podemos atopalas tamén nos ratos heterocigotos *reeler*, que mostran unha expresión de en torno a un 50% de reelina, ademais dunha redución na expresión da GAD₆₇ ou no número de espiñas dendríticas.

Tal e como ocorre na esquizofrenia, os HRM tamén presentan alteracións no sistema dopaminérxico, na área tegmental ventral (*Ventral*

tegmental area, VTA), onde se atopou unha redución no número de células dopaminérxicas, as cales se identifican porque expresan tirosina hidroxilase (TH) que é o encima encargado de sintetizar dopamina (DA). No estriado ventral, atopamos unha redución da cantidade de ARN mensaxeiro dos receptores D2 de DA, mentres que os receptores D3 se atopan incrementados (Ballmaier e cols., 2002).

Ademais das características a nivel neuroanatómico e neurobiolóxico, tamén se describiron características a nivel de comportamento, que representan anomalías presentes nos pacientes con trastornos psiquiátricos.

Unha das probas do comportamento máis representativas é a inhibición do prepulso do reflexo de sobresalto acústico, que é unha proba para testar a activación sensorial e motora. Os déficits na activación sensorial e motora considéranse claves na esquizofrenia. Os ratos HRM presentan unha redución na inhibición do reflexo de prepulso respecto aos ratos WTM. Sábese que esta proba está representando anomalías neurobiolóxicas presentes nos principais sistemas de neurotransmisores (GABAérxico, glutamatérxico e dopaminérxico) localizados no córtex, hipocampo e estriado, que son áreas afectadas en trastornos psiquiátricos (Tueting e cols., 2006; Qiu e cols., 2006b; Barr e cols., 2008).

Os ratos HRM mostran unha redución na capacidade de aprendizaxe, tal e como se demostra con probas de aprendizaxe condicionada. Estas alteracións están relacionadas co déficit nos

procesos de plasticidade a longo prazo e co déficit na regulación inhibitoria das células piramidais da CA1 do hipocampo (Tueting e cols., 2006; Qui e cols., 2006b). Tamén se viron déficits na aprendizaxe e memoria cando se someten a probas como o labirinto radial. Así mesmo, presentan maior vulnerabilidade cós ratos con xenotipo salvaxe cando se lles inxectan fármacos antagonistas de receptores NMDA, como o MK801, presentando maiores alteracións cognitivas (Carboni e cols., 2004). Tamén se describiron problemas na discriminación olfactiva así como déficits na aprendizaxe de tarefas que implican dita habilidade. Erros na discriminación olfactiva tamén son característicos de pacientes esquizofrénicos (Larson e cols., 2003).

Xunto a estes déficits descritos nos HRM tamén atopamos unha lixeira actitude depresiva: tras un período de illamento social, a agresividade mostrada fronte a un individuo alleo é atípica, xa que pasa rapidamente a un estado de indiferenza (Costa e cols., 2002).

Os déficits na expresión de reelina, así como nos sistemas de neurotransmisores principais, que comportan alteracións sinápticas e neurobiolóxicas teñen implicacións a nivel de comportamento. As manifestacións destas alteracións nos HRM son moi sutís e controvertidas, posto que nestes animais non hai unha redución homoxénea nos niveis de reelina, e isto, pode levar a contradicións respecto aos déficits en comportamento (Podhorna e Didriksen, 2004).

7.- MODELOS ANIMAIS DE DEPRESIÓN

A depresión caracterízase por unha serie de síntomas que inclúen ademais de humor irritable e depresivo, outras características como síntomas cognitivos, como sentimento de culpa ou intencións suicidas. Tamén mostran síntomas emocionais como a anhedonia que é a incapacidade de sentir pracer, e síntomas homeostáticos ou vexetativos, como alteracións no sono, no apetito, peso e enerxía. Ademais tamén se caracteriza por un exceso de actividade do eixe HPA, que se activa pola exposición continua a un evento estresante, e resulta nun cadoiro de eventos endócrinos (Nestler e Hyman, 2010).

Este cadoiro inclúe a liberación e o transporte do factor de liberación de corticotropina (*Corticotropin releasing factor*, CRF), dende neuronas do núcleo paraventricular (*Paraventricular nucleus*, PVN) do hipotálamo ata a pituitaria anterior, onde se estimula a liberación da hormona adrenocorticotropina (*Adrenocorticotropin hormone*, ACTH) (Figura 12). A ACTH libérase dende a pituitaria ata o sistema circulatorio e logo viaxa ata as glándulas adrenais, onde estimula a liberación de glicocorticoides, cortisol en humanos e CORT en ratos, ao torrente sanguíneo. Unha vez liberados, os glicocorticoides actúan sobre os tecidos corporais para limitar as funcións non fundamentais e para mobilizar enerxía e, así, facer fronte ao elemento estresante. Os glicocorticoides tamén viaxan cara o cerebro para exercer efecto inhibitorio sobre o PVN para deter a actividade do eixe HPA.

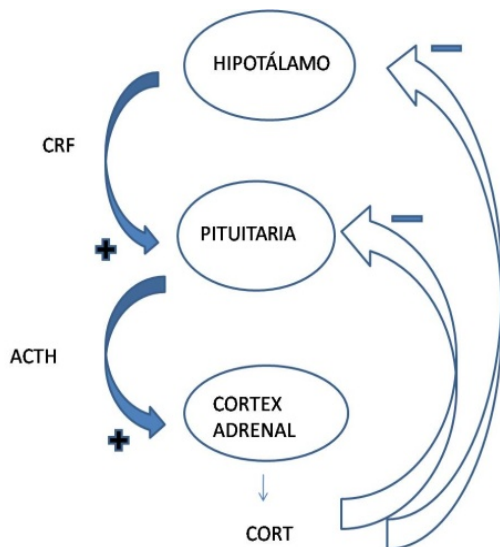


Figura 12: Esquema do funcionamento do eixe HPA.

O funcionamento correcto deste eixe HPA depende do hipocampo. Este expresa receptores de mineralocorticoides (MR) e receptores de glicocorticoides (GR). Os MR teñen unha elevada afinidade pola CORT e, así, estes están activados cando os niveis de CORT son baixos. Pola contra, os GR teñen unha baixa afinidade por esta hormona, co cal están activos só cando os niveis da mesma son elevados. Estes GR son moi importantes para o control negativo do HPA. Cando os niveis de GR son elevados, promóvese a inhibición do PVN e así a actividade do HPA está controlada. Non obstante, cando os niveis de GR hipocámpais son baixos, a inhibición é insuficiente e calquera estímulo que active o eixe HPA terá como consecuencia un incremento esaxerado dos niveis de CORT. Deste xeito, o hipocampo é especialmente sensible á prolongada exposición a estrés. Observouse

unha redución na arborización dendrítica nas neuronas piramidais da CA3, unha menor neuroxénese e unha menor expresión do ARN mensaxeiro dos GR. É sabido que os pacientes con depresión mostran hipercortisolemia e unha regulación inadecuada do ciclo do cortisol. Unha prolongada activación do eixe HPA causa graves problemas de saúde, inclusive inmunosupresión, inhibición do crecemento, problemas de sono, danos na memoria, redución do comportamento sexual e disforia crónica (Parker e cols., 2003; Herman e cols., 2003; Sterner e Kalynchuk, 2010).

Nestes pacientes, as áreas cerebrais que controlan a adaptación ou a resposta a determinado ambiente están alteradas. Estas áreas cerebrais, amígdala e hipocampo, encargadas de modular e mediar as respostas emocionais, están sobreactivadas. E as áreas que inhibirían ou controlarían estas emocións, como o córtex subxenuel prefrontal, o prefrontal dorsolateral e orbitofrontal, están inhibidas. Nestas áreas atopamos GR, co cal, o incremento nos glicocorticoides asociados a un estrés prolongado poderían causar danos anatómicos e estruturais nas áreas descritas. Sábese que hai unha redución no volume hipocampal e no córtex prefrontal (*Prefrontal cortex*, PFC), que son as encargadas de inhibir o eixe HPA, mentres a amígdala, encargada de activar este eixe, mostra un incremento no seu volume. Así mesmo, viuse que existen atrofia dendrítica e morte celular no hipocampo e no PFC, e hipertrofia celular na amígdala (Sterner e Kalynchuk, 2010).

Aínda que os síntomas da depresión son moi variables entre pacientes, o obxectivo nos últimos anos foi buscar un modelo animal que mostre as características neurobiolóxicas e de comportamento desta enfermidade en humanos. Evidentemente non todos os síntomas que mostran os pacientes con depresión poden ser estudados nun modelo animal, tales como as intencións suicidas; non obstante, outras características como os danos na memoria, alteracións no sono, anhedonia e incapacidade de aprendizaxe, entre outros, si que poden ser estudadas mediante probas de comportamento.

Para desenvolver un bo modelo animal téñense que ter en conta unha serie de criterios:

Validez etiolóxica ou construtiva: os factores que levan á aparición da enfermidade en humanos teñen que estar presentes neste modelo, tales como unha mutación xénica, para que así, causen as mesmas alteracións de comportamento e neurolóxicas. O problema que se soe ter neste punto é que se descoñece cal é o factor que está causando a enfermidade.

Validez de feito: o modelo animal ten que recapitular as mesmas alteracións comportamentais, neurobiolóxicas e anatómicas que a enfermidade en humanos.

Validez predictiva ou farmacolóxica: implica que o modelo animal ten que responder ós tratamentos da mesma forma en que se presupón que o farán os humanos (Nestler e Hyman, 2010).

Creáronse unha serie de modelos animais nos que se observa que o estrés e perda de control emocional supoñen potentes factores de risco para padecer depresión.

Un dos máis comúns é o modelo de estrés crónico medio. Neste modelo, os ratos son sometidos a situacións de estrés físico de forma repetida, por exemplo a restrición de movementos ou descargas eléctricas nos pés. Este modelo ten validez de feito, posto que presenta anhedonia cando se realiza a proba da preferencia pola sacarosa. Tamén presentan validez farmacolóxica posto que estes síntomas de depresión revértense cando se lles administra tratamento con antidepressivos (D'Aquila e cols., 1997; Nestler e Hyman, 2010).

Outro modelo é o modelo de estrés por derrota social crónica. Neste modelo represéntase a anhedonia e síntomas metabólicos como a ganancia de peso, polo que cumprirían coa validez de feito e a validez farmacolóxica. Incluso, con este modelo animal pódese estudar outra característica interesante que é a resiliencia, ou capacidade dun suxeito para sobrepoñerse a situacións traumáticas ou dolorosas incluso cando non presentan síntomas metabólicos ou de comportamento (Nestler e Hyman, 2010).

A depresión é un trastorno moi heteroxéneo con síntomas que se manifestan a múltiples niveis e que poden ter múltiples puntos de orixe, baseándose nesta idea creouse unha das vertentes máis novidasas que son os modelos animais modificados xenéticamente, con este modelo

pódese alterar a expresión dun receptor, un transportador ou un encima en concreto e ver os efectos de dita mutación. En moitos casos xeráronse ratos mutantes para moléculas que xa é coñecido que son dianas de actuación de antidepressivos, como sería o caso do transportador de noradrenalina, o sistema serotoninérxico ou o GABAérxico (Cryan e Mombereau, 2004).

MODELOS ANIMAIS DE DEPRESIÓN: TRATAMENTO PROLONGADO CON CORTICOSTERONA

Un problema que se soe presentar nos modelos animais é que non sempre son consistentes nos resultados, dado que son moi variables segundo o tempo e o tipo de estrés ao que se ve sometido o animal. Tamén é moi importante ter en conta a cepa coa que se está a traballar, posto que se sabe que hai diferenzas entre elas nas respostas fronte a diferentes situacións estresantes. Ademais, non se controlan os niveis individuais da activación do eixe HPA así como os niveis de CORT circulante. Tamén se debe ter en conta que estes animais chegan a se acostumar ás probas ás que son sometidos (Cryan e Mombereau, 2004; Zhao e cols., 2008b; Nestler e Hyman, 2010).

Por este motivo, desenvolveuse outro modelo animal baseado na inxección esóxena de CORT durante un período crónico de tempo. Este modelo permitiu establecer que a inxección de CORT durante 21 días en roedores provoca un comportamento semellante ao depresivo e ademais

estes resultados son reproducibles (Kalynchuk e cols., 2004; Gregus e cols., 2005; Zhao e cols., 2008b). Con este modelo soluciónase a variabilidade individual en canto á activación do eixe HPA, tamén se soluciona a influencia do xénero sobre os resultados das probas, logrando un comportamento homoxéneo entre machos e femias cando se someten a probas como o test de campo aberto. Isto non ocorre cando se traballa cos modelos animais anteriormente mencionados (Kalynchuk e cols., 2004).

Por outra banda, tamén se ten en conta o modo de administración da CORT, sendo o máis adecuado a inxección da mesma en comparación coa administración na comida ou bebida, xa que coa inxección se garante o incremento dos niveis de CORT. Ademais, demostrouse que estes animais presentan redución de peso e un comportamento como depresivo cando se someten a probas como a natación forzada, a suspensión pola cola ou o test de campo aberto (Gregus e cols., 2005; Johnson e cols., 2006; Zhao e cols., 2008b).

Neste modelo tamén se detectou incapacidade para aprender, ansiedade, anhedonia e alteracións na memoria espacial, o que reflicte alteracións neurobiolóxicas a nivel da plasticidade sináptica e a neuroxénese do hipocampo. Parece que estes efectos serían consecuencia da actuación excesiva dos receptores de glicocorticoides, observada en animais tratados con CORT. A proteína de unión ao elemento de resposta a AMPc (*AMPc response element-binding protein*, CREB) e o BDNF son fundamentais para o mantemento destes procesos, e ambos

aparecen alterados neste modelo animal, do mesmo xeito que tamén se poden ver alterados no sistema límbico e áreas prefrontais en pacientes con depresión (Zhao e cols., 2008b; Sterner e Kalynchuk, 2010).

Deste xeito, este modelo animal presenta validez construtiva posto que sábese que o estrés crónico e o consecuente incremento nos niveis de CORT supoñen un factor de vulnerabilidade fronte a depresión (Parker e cols., 2003), así mesmo con este modelo animal puidéronse reproducir a meirande parte dos síntomas neurobiolóxicos e de comportamento presentes en pacientes con depresión (Kalynchuk e cols., 2004; Sen e cols., 2008; Lussier e cols., 2009; Sterner e Kalynchuk, 2010) polo que podemos dicir que tamén presenta validez de feito. Ademais veuse que estes animais reverten estes síntomas tras un tratamento con antidepressivos polo tamén cumpriría coa validez farmacolóxica (David e cols., 2009), considerando todo isto poderíamos concluír que este modelo animal suporía un modelo apropiado para estudar a depresión, saber os mecanismos concretos alterados e o efecto de posibles tratamentos.

Xustificación e obxectivos

A reelina é unha proteína da matriz extracelular que regula a migración neuronal durante o desenvolvemento do sistema nervioso central, e no cerebro adulto intervén en procesos de plasticidade sináptica. Hai algo máis dunha década viuse que, en mostras *post mortem* de esquizofrenia e de trastorno bipolar con psicose, había unha diminución importante e xeneralizada dos niveis de reelina de ata un 50%, en distintas áreas cerebrais (Impagnatiello e cols., 1998; Guidotti e cols., 2000). De feito, os ratos heterocigotos *reeler* tamén teñen niveis de reelina que son máis ou menos a metade do habitual e amosan algunhas alteracións neuroquímicas e neuroanatómicas que en parte asemellan ás observadas na esquizofrenia (Tueting e cols., 1999).

Namentres na esquizofrenia e no trastorno bipolar con psicose hai unha diminución xeneralizada de reelina en áreas corticais, na depresión non parece haber dita diminución (Guidotti e cols., 2000), aínda que parece existir unha diminución de reelina no hipocampo e, particularmente, no xiro dentado (Fatemi e cols., 2000). Isto resulta de grande interese porque as hipóteses máis novas sobre a etioloxía da depresión propoñen as alteracións na neuroxénese así como na integración das novas neuronas e o establecemento de novas conexións, como eventos claves na neurobioloxía da depresión asociados aos efectos neurodexenerativos motivados polo estrés (Samuels e Hen, 2011).

Na presente tese doutoral pretendemos afondar no coñecemento sobre como alteracións debidas a estrés poden dar lugar a unha

diminución na expresión de reelina no hipocampo e particularmente no xiro dentado; e cales son as posibles consecuencias sobre a neuroxénese presente no hipocampo e sobre o comportamento que asemella ao observado na depresión.

Neste traballo utilizamos basicamente un modelo animal de depresión baseado na inxección crónica da hormona estresante corticosterona (Sternier e Kalynchuk, 2010), e os ratos heterocigotos *reeler* que amosan niveis baixos de reelina *per se*, e presupoñemos que dita diminución fará que sexan máis sensibles aos efectos depresoxénicos da corticosterona.

Para avaliar dita hipótese, formulámonos os seguintes obxectivos:

1. Análise dos efectos de diferentes doses de corticosterona administradas durante 21 días sobre o comportamento dos ratos de xenotipo salvaxe e os ratos heterocigotos *reeler*.
2. Análise das modificacións relacionadas coa reelina e neuroxénese no hipocampo adulto, motivadas pola administración de diferentes doses de corticosterona.
3. Estudo de alteracións da coexpresión do encima óxido nítrico sintetase neuronal e da reelina no hipocampo dos ratos de xenotipo salvaxe e dos ratos heterocigotos *reeler*.
4. Análise do posible efecto da corticosterona sobre a coexpresión da óxido nítrico sintetase neuronal e da reelina no hipocampo dos ratos heterocigotos *reeler*.
5. Estudo das alteracións dalgúns marcadores de plasticidade sináptica no hipocampo dos ratos heterocigotos *reeler* respecto aos ratos de xenotipo salvaxe.

Material e métodos

ANIMAIS

Neste traballo usáronse ratos de xenotipo salvaxe (*Wild type mice*, WTM), da cepa B6C3FeF1/J a/a, e ratos heterocigotos *reeler* (*Heterozygous reeler mice*, HRM), da cepa B6C3Fe-a/a-ReIn rl/+ (Laboratorios Jackson, Bar Harbor, EUA), que mostran un 50-60% menos de reelina có xenotipo salvaxe. Para realizar este estudo usáronse un total de 204 ratos adultos machos: 102 ratos WTM e 102 HRM, procedentes da nosa propia colonia de cría. As parellas proxenitoras son do xenotipo heterocigoto. Todos os animais empregados tiñan entre 3 e 5 meses de idade. Os animais estiveron baixo condicións controladas, con ciclos de luz e escuridade de 12 horas e a 20°C. Dispuxeron de comida e auga *ad libitum*.

Todos os tratamentos, procedementos e experimentos fixéronse segundo as normas da directiva do Consello da Comunidade Europea do 24 de novembro 1986 (86/609/EEC), do decreto real 1201/2005 e do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

PROCEDIMENTO DO XENOTIPADO

O xenotipado foi realizado no noso laboratorio seguindo o protocolo de PCR descrito por D'Arcangelo e col. (1995), a partir dunha mostra de tecido procedente da cola. Os cebadores usados foron os seguintes:

5'-TAA TCT GTC CTC ACTCTG CC-3'

3'-ACA GTT GAC ATA CCT TAA TC-5'

3'-TGC ATT AAT GTG CAG TGT TGT-5'

O tecido mantense en 250 µl de tampón de lise durante toda a noite a 65°C. A extracción de ADN faise mediante o método de fenol-cloroformo:

1.- Engadimos a mesma cantidade de fenol-cloroformo-isoamil (25:24:1) que volume de lisado temos e centrifugamos a 4000 rpm durante 5 minutos. Con este paso separamos a fase acuosa da fase orgánica.

2.- Extraemos 100 µl do sobrenadante, que contén a fase acuosa, e pasámolo a outro tubo eppendorf. Sobre isto engadimos 100 µl de cloroformo, que contribúe a eliminar os restos da fase orgánica que poidan quedar. Centrifugamos durante 5 minutos a 12000 rpm.

3.- Tras a centrifugación extraemos de novo o sobrenadante onde xa temos o ADN. Sobre este sobrenadante engadimos 250 µl de etanol de 100% prearrefriado. Con este paso precipitamos o ADN que aparece como unha nube branca. Centrifugamos 30 minutos a 12000 rpm e a 4°C para completar a precipitación dos ácidos nucleicos.

4.- Queda un pequeno precipitado branco que volvemos a lavar con etanol de 70% tamén prearrefriado. Centrifugamos durante 10 minutos a 14000 rpm e a 4°C.

5.- O ADN deixase secar para eliminar os restos de etanol, o cal pode inhibir a actividade da TAQ (*Thermus Aquaticus*) (BioTaq DNA Polimerase, Bioline, BIO-21060), resuspendemos en 45 μ l de H₂O miliQ e quentamos a 55°C durante 10 minutos.

O ADN pódese conxelar a -20°C ata o momento da súa utilización.

Os fragmentos de ADN amplificados foron analizados nun xel de agarosa ao 2%. O produto de PCR correspondente ó ADN do WTM ten unha lonxitude de 266 pb, o correspondente ó alelo mutante ten 363 pb e o HRM presenta ambas bandas. Vemos un exemplo na figura 1.

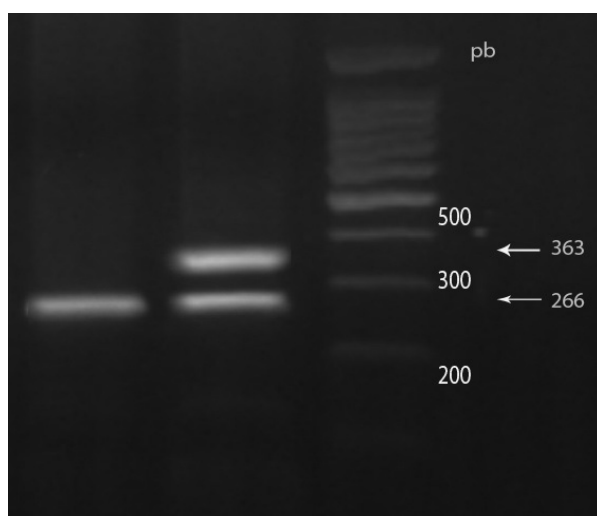


Figura 1: Exemplo dun xel de agarosa ó 2% no que visualizamos mediante bromuro de etidio (BrEt) as bandas de ADN. A banda correspondente ó mutante *reeler* ten un peso de 363 pb e a do non mutante ten un peso de 266 pb.

1.- GRUPOS EXPERIMENTAIS

GRUPO EXPERIMENTAL 1

No grupo experimental 1 estudouse o efecto da administración crónica de CORT sobre o comportamento dos ratos HRM. Para este estudo empregáronse 90 ratos machos adultos: 45 WTM e 45 HRM, de entre 3 e 5 meses. Os animais asignáronse aleatoriamente aos diferentes grupos de tratamentos: un grupo control, ao que se lle inxectou solución salina (NaCl 0,9%), e os grupos correspondes ás tres doses de CORT inxectadas: 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg. Para cada dose empregáronse 11 ratos WTM e 11 ratos HRM, agás no grupo da dose de 20 mg/kg no que se empregaron 12 ratos por cada xenotipo.

As doses foron escollidas en base a estudos previos realizados en ratas onde se analizaron que doses causaban maiores efectos, e máis reproducibles, sobre o comportamento (Kalynchuk e cols., 2004; Johnson e cols., 2006). Máis recentemente fixéronse eses mesmos estudos en ratos e testouse o período de tempo de administración e a dose de CORT máis axeitada para xerar nos ratos un comportamento semellante ó depresivo (Zhao e cols., 2008 e 2009).

As doses prepáranse 24 horas antes de inxectalas. A CORT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, #27840-500MG) dilúese en solución salina ao 0,9% (NaCl 0,9%) e con polioxietileno glicol sorbitán monooleato 2% (Tween-80, Sigma Aldrich, St Louis, MO, P8074-500ML).

Inxéctase un volume de 5 ml/kg a cada animal durante 21 días consecutivos entre as 9 e 11 da mañá.

GRUPO EXPERIMENTAL 2

Neste grupo experimental 2 empréganse os mesmos animais que foron usados no grupo experimental 1.

Tras finalizar o período de administración da CORT e realizar as probas de comportamento, os animais son sacrificados para obter o cerebro e realizar unha análise estereolóxica das posibles alteracións neurobiolóxicas que poidan presentar estes animais considerando, que *per se*, son mutantes para a reelina e que os estudos previos realizados en ratas probaron reducións significativas no número de células reelina positivas na SGZ do xiro dentado (Lussier e cols., 2009).

Por outra banda, no hipocampo e, concretamente, na SGZ existe xeración de novas neuronas durante a vida adulta e sábese que o estrés crónico ten un efecto negativo sobre a neuroxénese polo que tamén analizamos posibles cambios a nivel da neuroxénese estudando o número de células que expresan a DCX, que é unha proteína de unión a microtúbulos que se expresa en neuronas formadas de novo que xa son case maduras. Así mesmo, faise unha análise semicuantitativa da morfoloxía e do grao de desenvolvemento da súa arborización dendrítica.

GRUPO EXPERIMENTAL 3

A nNOS é o encima que sintetiza óxido nítrico o cal xoga un papel importante na migración neuronal, no establecemento de novas sinapses e na maduración das mesmas. Traballos previos demostraron que existían receptores para a reelina en células nNOS positivas no bulbo olfativo aínda que a reelina e a nNOS non parecían colocalizar (Hermann e cols., 2008). Neste estudo analízase a posible colocalización no hipocampo entre a nNOS e a reelina, dado que presentan tinguiduras inmunohistoquímicas moi semellantes, posto que ambas aparecen expresadas en interneuronas GABAérxicas. Así mesmo, analizaremos se dita colocalización está afectada pola menor expresión da reelina nos HRM.

Para levar a cabo esta parte do estudo empregáronse 16 ratos machos adultos de entre 3 e 5 meses, dos cales 8 son WTM e 8 son HRM.

Por outra banda, resulta de especial interese analizar en que medida se ve modificada a posible colocalización entre a reelina e a nNOS pola inxección de CORT, posto que a nNOS está afectada polos mecanismos que se activan polo estrés. Para realizar esta parte do estudo, empregouse exclusivamente a maior dose de CORT, a de 20 mg/kg, ademais dun grupo control. Os animais empregados neste grupo experimental e neste punto concreto non son os mesmos que os empregados nos grupos experimentais 1 e 2, nesta ocasión empregáronse 14 animais no grupo control, dos cales 7 son WTM e 7 son HRM e 16 animais no grupo con CORT, dos cales 8 son WTM e 8 HRM.

GRUPO EXPERIMENTAL 4

A reelina está implicada en procesos de plasticidade sináptica polo que para analizar se estes procesos se ven comprometidos pola menor expresión da reelina, estudouse a expresión de varios marcadores sinápticos nos WTM e a súa posible alteración nos ratos HRM.

Para estudar alteracións nas conexións sinápticas nunha visión xeral, empregouse un anticorpo para a SYN. Esta é unha proteína que aparece amplamente expresada en vesículas sinápticas nas terminais presinápticas. Para estudar a posible alteración na expresión da SYN empregáronse 20 animais: 10 WTM e 10 HRM.

Con posterioridade e para estudar as sinapses glutamatérxicas empregáronse anticorpos que recoñecen os transportadores vesiculares de glutamato tipo 1, 2 e 3 (VGLUT1, 2, 3). O VGLUT1 e 2 aparecen en terminacións nerviosas que establecen conexións excitatorias. Non obstante, o VGLUT3, a diferenza dos anteriores, tamén pode aparecer no soma neuronal e en conexións asimétricas e simétricas. Para realizar esta parte do estudo empregáronse 16 ratos para cada un dos marcadores, 8 WTM e 8 HRM.

Todos os animais empregados neste grupo experimental eran machos adultos cunha idade comprendida entre 3 e 5 meses.

2.- PROCEDEMENTO

PROBAS DE COMPORTAMENTO

No grupo experimental 1, realizáronse unha serie de probas de comportamento para testar se os ratos HRM mostran maior vulnerabilidade á administración de diferentes doses de CORT durante 21 días.

As probas efectuadas foron as seguintes:

- ✓ Test de natación forzada.
- ✓ Test de campo aberto.
- ✓ Test de preferencia de sacarosa.

Os tests de natación forzada e campo aberto foron gravados en vídeo e realizáronse entre as 11 da mañá e as 7 da tarde.

Test de natación forzada

Para realizar dito test empregamos un vaso de precipitados de Pyrex, transparente de 3 litros. Empregouse auga a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ cunha profundidade de 15 cm. A proba de comportamento dura 6 minutos e analízase o tempo, en segundos, de inmovilidade, natación e loita, que ocorren durante os últimos 4 minutos da proba (Porsolt e cols., 1977). A inmovilidade defínese como o tempo no que o animal non move a cabeza nin o corpo (simplemente aboia); a natación é cando existe movemento e a loita é cando os animais fan movementos máis fortes cós

de natación, normalmente contra a parede do vaso. A auga cambiouse entre cada animal.

Test de campo aberto

A proba do campo aberto realizouse nunha caixa de madeira de 40 cm x 40 cm x 40 cm, adaptación do modelo deseñado por Sherif e cols. (1995). O animal colocouse no centro da caixa e gravouse a súa actividade durante 10 minutos. Os catro cuadrantes interiores considéranse como o centro e os doce exteriores son a periferia. Os parámetros a medir foron os seguintes: o tempo en deixar a área do centro ou latencia; tempo dedicado no centro; tempo dedicado na periferia; distancia recorrida en total. O tempo expresouse en segundos e a distancia en centímetros. O comportamento codificouse co software Ethovision (versión 3.0; Wageningen, Holanda).

Proba da preferencia de sacarosa

A proba da preferencia de sacarosa realizouse segundo Strekalova e cols. (2010). O test durou tres días en total, aínda que o último foi o no que realmente se comproba a preferencia de sacarosa. O test realizouse durante a noite que é o período de actividade dos ratos, comezando ás 8 da tarde. No primeiro día os animais adestráronse para beber dos dous lados da caixa e, para iso, déronse dúas botellas de auga durante 12 horas, evitando así o efecto de preferencia do lado. O segundo día déuselles sacarosa ao 8%, unha concentración dúas veces

superior do que se usará no test final, durante 3 horas. O terceiro día, déronselles dúas botellas: unha con auga e outra con sacarosa ao 4%, durante 12 horas, intercambiándose de lado na metade do test. As botellas pesáronse antes e despois de cada test.

MÉTODOS HISTOLÓXICOS

O tecido dedicado para os grupos experimentais 2, 3 e 4 foi fixado mediante perfusión a través do arco aórtico. Lávase o sangue con NaCl ao 0,9% ata que deixa de saír sangue e a continuación fíxase con 50 ml de paraformaldehído ao 4% (PFA 4%). Os cerebros retíranse do cráneo rapidamente e déixanse durante 24 horas en postfixación en PFA 4% a 4°C, lávase con tampón fosfato ao 0,1M (PB 0,1M) durante outras 24 horas á mesma temperatura e, finalmente, crioprotéxese nunha solución de sacarosa ao 30% con azida sódica ao 0,01%. Este produto é un antifúnxico polo que o tecido pode almacenarse nesta solución ata o momento do seu uso.

No momento do procesamento do tecido, este inclúese nunha mestura ao 50% de: sacarosa 30% e medio de inclusión (OCT Compound, Tissue Tek) durante 15 minutos. Posteriormente o tecido inclúese en OCT puro e queda repousando durante outros 15 minutos. Para conxelalo dunha forma rápida e uniforme úsase isopentano prearrefriado en nitróxeno líquido. O cerebro incluído en OCT dentro dun molde, colócase en contacto co isopentano e así somérxese en

nitróxeno líquido. A área cortada corresponde ás coordenadas -1,46 mm a -2,06 mm dende o bregma, establecida seguindo o atlas “The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates”, Academic Press, (Paxinos e Franklin, 2004). As seccións teñen 35 µm de grosor e efectúanse nun crióstato Leica CM1850 a -20°C.

O tecido é recollido en flotantes nunha serie en paralelo e almacenado a 4°C e en anticonxelante, que é unha mestura de etilenglicol/glicerol en PB 0,1M ata que foi usado.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Nos grupos experimentais 2, 3 e 4 a principal técnica empregada foi a inmunohistoquímica (IHQ), baseada na capacidade dos anticorpos de recoñecer especificamente un antíxeno.

O tecido lávase previamente en tampón TRIS-HCL pH 7,4 para eliminar os posibles restos de anticonxelante.

Inmunohistoquímicas simples

Mediante a IHQ podemos estudar a expresión de proteínas nunha área determinada do cerebro e, para iso, empregaremos anticorpos que recoñecen especificamente esa proteína.

Os anticorpos primarios inclúense nunha mestura de bloqueo que contén soro normal de cabra (*Normal goat serum*, NGS) ao 15% e un

deterxente que permite permeabilizar o tecido, TRITON X-100 ao 0,5% e todo isto diluído en TRIS-HCL pH 7,4.

A inmunohistoquímica de DCX require recuperación antixénica con citrato pH 6 a 95°C durante 30 minutos. Con esta recuperación antixénica rompemos os enlaces aldehído que forman o PFA e desta maneira expoñemos máis o antíxeno e facilitamos a unión do mesmo co anticorpo secundario.

Os anticorpos primarios e as dilucións empregadas son:

Anticorpo primario	Dilución
Anti-SYN (Lab Vision Corporation, #RB 9044-P1)	1:1000
Anti-VGLUT1 (Chemicon, #AB5905)	1:5000
Anti-VGLUT2 (Synaptic Systems, #135403)	1:1000
Anti-VGLUT3 (Synaptic Systems, #135203)	1:1000
Anti-Reelina (Millipore, #MAB5364)	1:2000
Anti-DCX (Cell Signaling, #4604)	1:1000

Os anticorpos primarios incúbanse durante unha noite, exceptuando a DCX que se incuba durante 24 horas, a temperatura ambiente, e a reelina que se fai durante 48 horas a 4°C. Aos anticorpos primarios únense os anticorpos secundarios que son xerados especificamente para recoñecer antíxenos do animal no que foron obtidos os primarios.

Tras a incubación co anticorpo primario, efectúanse dous lavados con TRIS-HCL pH 7,4 durante dez minutos e a continuación

bloqueamos a peroxidase endóxena con H_2O_2 ao 10% no mesmo tampón durante 30 minutos.

Volvemos efectuar dous lavados con tampón antes de incubar as seccións cos anticorpos secundarios durante 1 hora. Os anticorpos secundarios inclúense na mesma mestura de bloqueo na que se incubaron os primarios.

As combinacións de secundarios son:

Anticorpo primario	Anticorpo secundario	Dilución
Anti-SYN	GARb (Cabra contra coello) (DAKO)	1:200
Anti-VGLUT1	GAGuib (Cabra contra cobaia) (Chemicon)	1:500
Anti-VGLUT2	GARb (Cabra contra coello) (DAKO)	1:500
Anti-VGLUT3	GARb (Cabra contra coello) (DAKO)	1:500
Anti-Reelina	GAMb (Cabra contra rato) (DAKO)	1:500
Anti-DCX	GARb (Cabra contra coello) (DAKO)	1:500

Elimínase o exceso de anticorpo secundario mediante dous lavados con tampón TRIS-HCL pH 7,4, e incúbase durante 30 minutos co complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABComplex, Vector). Lavamos con tampón e a reacción revélase empregando unha solución de 3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzindina (DAB, Sigma) en tampón TRIS-HCL e 0,003% de H_2O_2 . O tempo de revelado varía segundo a inmunohistoquímica. Eliminamos os restos de DAB mediante lavados con tampón. Colocamos as seccións en portaobxectos e, tras

deixalos secar, lávanse con H₂O destilada. Finalmente deshidrántanse nunha batería crecente de alcois, acláranse con xilol e móntase con Eukitt (Panreac).

Para evitar posibles variacións na inmunorreactividade entre as distintas seccións e individuos que alteren os resultados, todas as IHQs foron feitas en paralelo.

Inmunohistoquímicas dobres

Mediante a inmunohistoquímica tamén podemos estudar a posible coexpresión de dúas proteínas na mesma célula. Para isto é preciso empregar dous anticorpos primarios obtidos en distintas especies para evitar que os secundarios se unan indistintamente a eles, o que daría falsos positivos. Estes anticorpos primarios poden incubarse ao mesmo tempo e o método usado para visualizar a unión é a fluorescencia. Neste caso empréganse anticorpos secundarios unidos a fluoróforos, que teñen un espectro de emisión distinto para evitar cruzamentos de sinal.

Os anticorpos primarios incúbanse durante 18 horas a temperatura ambiente, nunha mestura de bloqueo composta por NGS 15%, TRITON X-100 ao 0,5% e neste caso con TRIS-HCL pH 7,4 con albumina bovina (*Bovine serum albumin*, BSA) ao 2%.

Nesta inmunohistoquímica é necesario facer unha recuperación antixénica con citrato pH 6 a 95°C durante 30 minutos.

Os anticorpos primarios nas inmunohistoquímicas fluorescentes son:

Anticorpo primario	Dilución
Anti-Reelina (Millipore, #MAB5364)	1:150
Anti-nNOS (Sigma, #N7280)	1:250

Fixéronse dous lavados de 10 minutos con TRIS-HCL pH 7,4 e posteriormente incubáronse cos anticorpos secundarios fluorescentes durante 2 horas.

Os anticorpos secundarios son os que seguen:

Anticorpo primario	Anticorpo secundario	Dilución
Anti-Reelina	GAM-Alexa 488 (Cabra contra rato) (Invitrogen)	1:200
Anti-nNOS	GAR-Alexa 546 (Cabra contra coello) (Invitrogen)	1:200

Fanse lavados con TRIS-HCL pH 7,4 para eliminar os restos de anticorpo. A continuación, as seccións colócanse nun portaobxectos e déixanse secar aproximadamente unhas cinco horas, tras o cal fanse lavados con H₂O destilada para eliminar as sales residuais do tampón. Deixamos secar e montamos as preparacións con Mowiol (Calbiochem, #475904).

ESTRATEGIAS DE CUANTIFICACIÓN

A cuantificación das proteínas anteriormente descritas fíxose con diferentes estratexias dependendo do patrón de expresión de cada unha delas.

No grupo experimental 2 cuantificáronse as células piramidais en cesto reolina positivas da SGZ do xiro dentado e nas células do hilus, para ver o efecto das diferentes doses de CORT sobre elas. Neste caso a cuantificación fíxose nun microscopio Nikon E800 acoplado a un sistema de estereoloxía StereoInvestigador, versión 9.0 (MicroBrithField Inc, Williston, VT). Este mesmo sistema empregouse na cuantificación das células positivas para DCX, para analizar se o tratamento con CORT ten efecto na neuroxénese presente no xiro dentado. O número total de células foi estimado segundo a fórmula :

$$N_{total} : \Sigma Q \cdot 1/ssf \times A(x,y \text{ posición})/a \text{ (área)} \times t/h$$

onde: ΣQ é o número de células contadas; ssf , é a fracción da sección analizada (1/6); $A(x,y)$ é a área asociada con cada movemento no eixe xy ($5625\mu m^2$); a (área) é a área de reconto ($2500\mu m^2$); t , é a media do grosor da sección; e h é a altura do disertor ($12\mu m$). Unha distancia de garda, de $5\mu m$, usouse durante o reconto celular para evitar calquera artefacto.

Ademais nas células DCX positivas tamén se analizou dunha forma semicuantitativa a morfoloxía e a arborización dendrítica segundo as categorías establecidas por Plümpke e cols. (2006). Segundo este

criterio establécense 6 categorías baseadas na presenza e extensión das dendritas apicais como podemos ver descritas na figura 2.

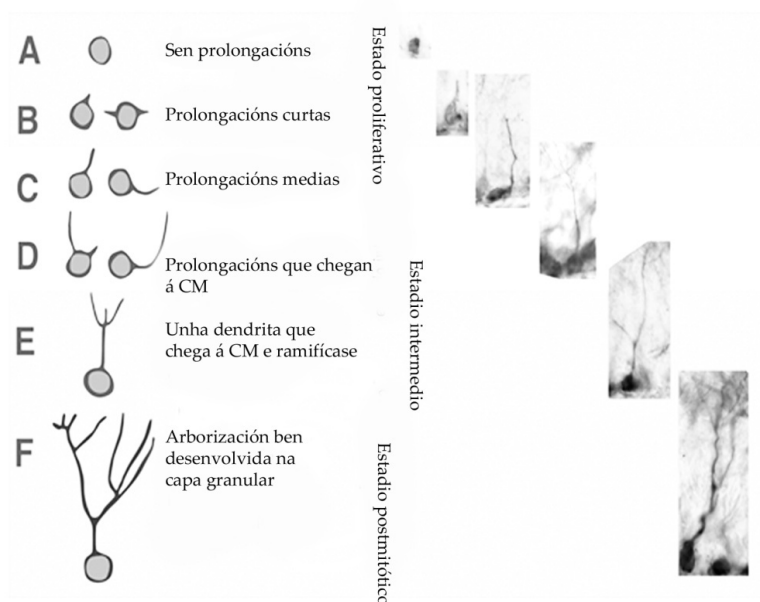


Figura 2: Categorización das células DCX segundo Plümpe e cols. (2006). CM: capa molecular. (Modificado de Plümpe e cols.).

Os resultados dos recontos realizados no grupo experimental 2 exprésanse como número de células por μm^2 no caso da cuantificación das células reelina positivas e DCX positivas. Cando se fai a análise do nivel de desenvolvemento das células que están formando novas no xiro dentado exprésase como porcentaxe de células DCX pertencentes a cada unha das categorías.

No caso particular do grupo experimental 3, é dicir do estudo da colocalización da proteína reelina e a nNOS, non se fai unha análise cuantitativa como no grupo experimental anterior, senón que facemos un estudo semicuantitativo. Os recontos fixéronse usando un microscopio óptico Olympus AX70 co obxectivo de 40x. Confírmase dita colocalización analizando as mostras no microscopio confocal Leica TCS SP2. Contamos todas as células reelina positivas en cada capa e, a continuación, analizamos cantas destas células que expresan reelina tamén expresan nNOS. Isto analízase en tres seccións separadas entre si $35\ \mu\text{m}^2$ e cos resultados de cada unha delas facemos unha media de colocalización. Os resultados obtidos neste grupo experimental non son en termos absolutos posto que estamos facendo unha análise semicuantitativa. Os datos exprésanse nas táboas en termos de porcentaxe de células reelina positivas que expresan nNOS.

O caso do grupo experimental 4 ten a complicación de que a SYN e os VGLUT1, 2 e 3 son proteínas que aparecen expresadas en vesículas nas terminais sinápticas polo que a súa marcaxe é moi fina e difusa, polo que empregamos a densidade óptica (DO) como método de análise e para isto empregaremos o software ImageJ 1.42q (NIH, USA). A análise fíxose sobre fotografías tomadas no microscopio óptico Olympus BX-51 conectado a unha cámara dixital en cor, Olympus DP-10 e empregouse o obxectivo de 4x, agás para o VGLUT2 e 3 para os que se usou o 10x. Analízanse tres seccións por animal que están separadas $35\ \mu\text{m}^2$. O

valor correspondente á marcame inespecífica ou ao fondo propio da tinguidura inmunohistoquímica mídese no corpo caloso.

Cada capa analizada subdivídese en 6 áreas de medida, con cuxos valores obtense unha media. O valor final de densidade óptica para unha capa será a media das medias de cada sección extraendo o valor do fondo. Na figura 3 podemos ver un esquema de como se efectúan as medidas.



Figura 3: Exemplo da estratexia seguida para levar a cabo as medidas de densidade óptica. Fotografía correspondente a unha preparación de SYN tomada co obxectivo de 4x.

Este programa, ImageJ 1.42q, establece un rango de valores de densidade óptica que vai dende o 0 ao 255, onde 0 é o máximo valor de tinguidura e 255 corresponde ao mínimo valor (a versión do programa coa que nós traballamos establéceo así). Os valores de densidade óptica que nós obtivemos normalizáronse respecto ao valor de fondo de cada

sección, polo que os números que se representan nas gráficas e nas táboas corresponden aos valores de densidade óptica normalizados.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todas as análises estatísticas realizadas neste traballo foron feitas con PASW Statistics 18 (Chicago, IL.).

Os resultados correspondentes aos grupos experimentais 1, 2 e 4 están expresados como media e máis menos o erro estándar da media (SEM), agás dentro do grupo experimental 2 onde os datos correspondentes á análise semicuantitativa das células DCX positivas exprésanse en termos de porcentaxes das medias máis menos a porcentaxe do erro estándar da media. Así mesmo, os resultados correspondentes ao grupo experimental 3 tamén se expresan en termos de porcentaxes das medias co seu erro correspondente.

Nos datos obtidos a partir dos grupos experimentais 1 e 2 manexamos información correspondente a varios grupos de animais nos que afectan diversas variables, polo tanto, faise necesario empregar dous tipos de análises: por unha banda unha ANOVA de dúas vías para analizar os posibles efectos diferenciais do xenotipo e da CORT sobre os parámetros medidos, como son o comportamento, o número de células reelina e DCX positivas e o número de células correspondente a cada categoría segundo o grado de desenvolvemento da arborización

dendrítica; e por outra banda unha ANOVA dunha vía para analizar o efecto da CORT especificamente sobre cada un dos xenotipos.

Esta mesma estratexia de análise estatística emprégase no grupo experimental 3 cando intentamos ver o efecto da CORT sobre a colocación da reelina coa nNOS en WTM e HRM.

No grupo experimental 3 no correspondente á análise do efecto da menor expresión de reelina sobre a colocación da mesma coa nNOS, e no grupo experimental 4 para todos os marcadores analizados, empregamos como test de análise unha T-Student, dado que estamos analizando as diferenzas nas medias dos valores obtidos nos WTM e nos HRM.

En todos os grupos experimentais considérase como significativas as diferenzas nas cales o valor de significación, $p < 0,05$.

Capítulo 1

Estudo dos efectos da administración
de corticosterona no comportamento
dos ratos heterocigotos *reeler*



1.1.- INTRODUCCIÓN

A depresión é unha síndrome que inclúe déficits a nivel cognitivo, como a perda de atención e de concentración, aparecen pensamentos negativos e lentitude mental. Presentan alteracións a nivel neurobiolóxico, como unha alteración no metabolismo dos glicocorticoides, cun incremento de cortisol e do CRF no fluído cerebroespinal e en áreas cerebrais tales como as rexións límbicas (Merali e cols., 2004). Tamén presentan anomalías do comportamento moi características como: tristura, redución na actividade física, alteracións do apetito e do sono, anhedonia e ansiedade, de entre outras (The Nice Guideline on the Treatment and Management of Depression in Adults, 2010).

Un estado de estrés continuo causa a hipercortisolemia descrita en pacientes con depresión (Parker e cols., 2003; Burke e cols., 2005) e isto fai que cada vez se validen máis os modelos animais que replican esta situación mediante a administración crónica de doses elevadas de CORT. Con isto conséguese controlar o eixe HPA e anular así as posibles diferenzas entre cada animal, facendo que os resultados obtidos neste estudos sexan máis reproducibles (Kalynchuk e cols., 2004; Sterner e cols., 2010).

Estudos con ratas e con ratos demostraron que a inxección de CORT causa un comportamento semellante ao depresivo, cando se

realizan probas como a natación forzada, onde se analiza o tempo que permanece inmóbil, o tempo que está nadando e o tempo de loita sen desprazamento (Kalynchuk e cols., 2004; Gregus e cols., 2005; Zhao e cols., 2008a). Esta proba reflicte o estado depresivo do animal e pódese empregar para testar se dito estado é revertido coa administración de antidepressivos (Porsolt e cols., 1977). Comprobamos a actividade motora destes animais mediante a proba do campo aberto, na que se analizan puntos clave como o tempo dedicado a moverse ou o tempo que tarda o animal en abandonar o centro da caixa. Con esta proba analízase a ansiedade que presentan estes animais cando se atopan nun ambiente non familiar (Sheriff e Orelan, 1995; Kalynchuk e cols., 2004). A anhedonia tamén se estuda como característica importante do comportamento e esta característica resulta moi interesante para testar un estado depresivo, así como a eficacia de antidepressivos (D'Aquila e cols., 1997; Strekalova e Steinbusch, 2010).

Estudos previos demostraron que a inxección crónica de CORT comporta anomalías no comportamento, levándoo a niveis representativos de trastornos depresivos, mentres que unha administración aguda pode implicar unha mellora (Gregus e cols., 2005; Lussier e cols., 2009; Zhao e cols., 2009). Ademais, nas ratas inxectadas con CORT tamén se detectou un menor número de células reelina positivas na SGZ do xiro dentado (Lussier e cols., 2009). Con outros modelos que simulan un estado depresivo mediante o sometemento dos animais a unha situación de estrés crónico físico non se puido detectar a

redución no número de células reelina positivas (Lussier e cols., 2009). Parece que a inxección de CORT comporta unha serie de alteracións a nivel neurobiolóxico e neuroquímico que non teñen lugar noutros modelos, e que estarían detrás das alteracións do comportamento.

A proteína reelina está implicada en procesos de plasticidade sináptica e maduración neuronal e, por outra banda, o hipocampo é unha zona cortical moi plástica onde teñen lugar procesos de aprendizaxe e de neuroxénese. Na depresión estes procesos están alterados, de feito, en pacientes con depresión atopouse unha redución na expresión de reelina no hipocampo, en concreto no xiro dentado (Fatemi e cols., 2000; Knable e cols., 2004).

Os HRM son mutantes para a proteína reelina, a cal só aparece expresada entre un 40% e 60% respecto dos WTM. Estes animais presentan características neurobiolóxicas comúns con trastornos psiquiátricos, aínda que a nivel de comportamento non se atoparon grandes alteracións (Tueting e cols., 1999 e 2006; Podhorna e Didriksen, 2004). A nosa hipótese propón que nos animais que presentan niveis baixos de reelina, é dicir, nos HRM, o efecto depresoxénico causado pola administración durante un período de 21 días de CORT será máis acentuado que no caso dos animais que amosan unha expresión normal de reelina. Este experimento levouse a cabo tal e como se explica no grupo experimental 1 de material e métodos.

1.2.- RESULTADOS

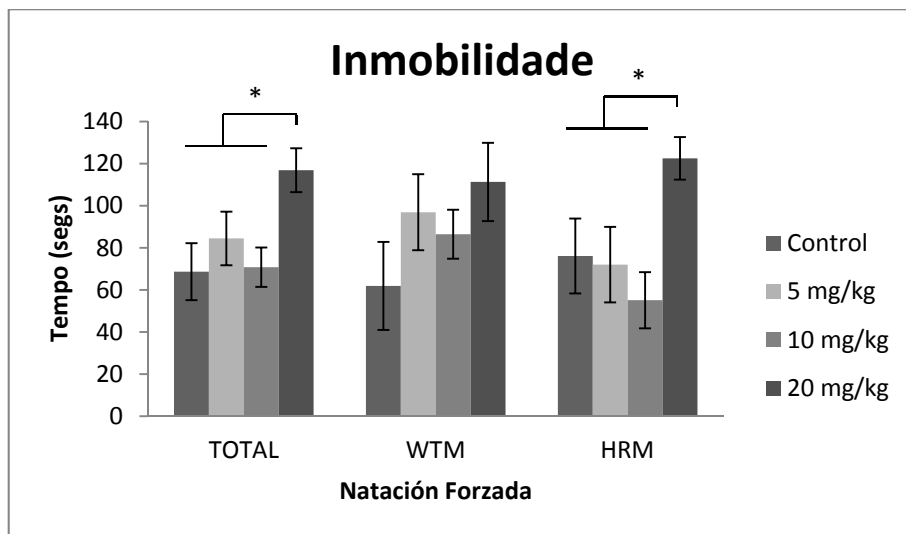
TEST DE NATACIÓN FORZADA

Na gráfica 1 representáanse os valores relativos ao tempo de inmovilidade. Os datos corresponden á ANOVA de dúas vías, e amosan que a dose de CORT é o factor máis determinante [$F(3, 77)=3,832$, $p<0,022$] mentres que o xenotipo parece non ter un efecto significativo [$F(1, 77)=0,439$, $p>0,5$], ademais non hai un efecto significativo da dose de CORT por interacción co xenotipo [$F(3, 77)=1,027$, $p>0,38$]. Os animais inxectados coa dose de 20 mg/kg están máis tempo inmóbiles cós animais inxectados con doses menores de CORT ou os controis. Este incremento é estatisticamente significativo, $p<0,05$. Cando aplicamos unha ANOVA dunha vía para analizar o que ocorre dentro de cada grupo vemos que dentro dos WTM non hai diferenzas significativas no tempo que están inmóbiles, a pesar de que se observa unha tendencia ao incremento. Dentro dos HRM a ANOVA dunha vía confirma que existe un efecto significativo da dose de CORT sobre o tempo que permanecen inmóbiles [$F(2, 38)=4,08$, $p<0,02$]. Estes datos tamén están representados na mesma gráfica 1. Os animais control e os inxectados con doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg pasan menos tempo inmóbiles cós que reciben a maior dose de CORT. Con isto podemos dicir que os ratos HRM son máis vulnerables ante un evento estresante presentando un

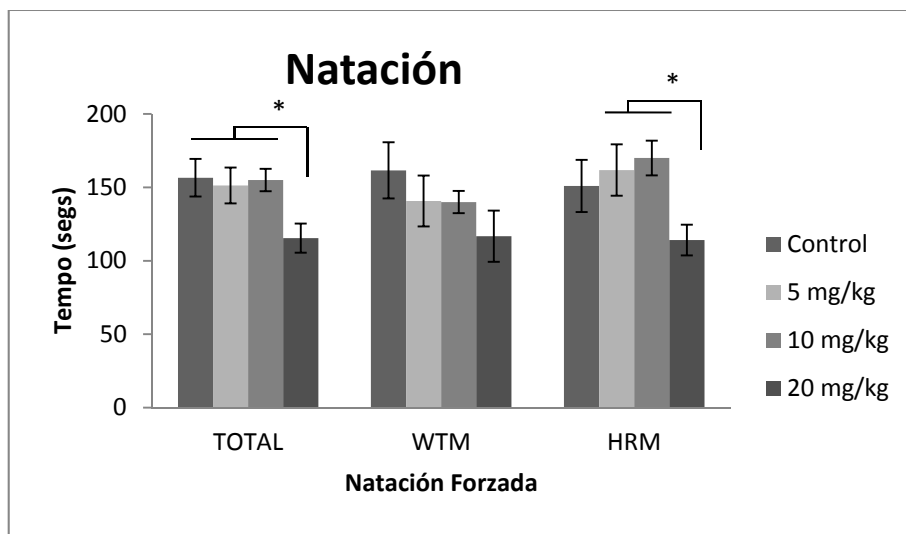
comportamento significativamente depresivo, como é un maior tempo de inmovilidade.

Outro factor a analizar é o tempo dedicado á natación. Para este valor a ANOVA de dúas vías confirmou que existe un efecto principal da dose de CORT sobre o comportamento [$F(3, 77)=3,425$, $p<0,03$], non obstante, o xenotipo parece non ter un efecto significativo sobre el [$F(1, 77)=0,749$, $p>0,38$] e tampouco hai interacción entre o xenotipo e a dose de CORT [$F(3, 77)=0,743$, $p>0,53$]. Os animais inxectados con 20 mg/kg de CORT dedican menos tempo a nadar cós pertencentes aos grupos con menores doses de CORT ou os controis. Esta diferenza é estatisticamente significativa. Esta representación pódese ver na gráfica 2. Tamén podemos ver graficamente os resultados obtidos para a análise pormenorizada en cada grupo xenotípico. De novo, os WTM non presentan diferenzas significativas, non obstante, presentan a mesma tendencia cá observada na visión global. Pola contra, a ANOVA dunha vía confirma que nos HRM hai un efecto significativo da dose de CORT sobre o tempo de natación [$F(2, 38)=3,16$, $p<0,04$] así como sobre o tempo de inmovilidade [$F(2, 38)=4,08$, $p<0,02$]. A mesma dose que causa un maior tempo de inmovilidade tamén causa un menor tempo de natación. Neste grupo as análises *post-hoc* demostraron cós animais con 20 mg/kg de CORT nadan menos tempo cós que recibiron as doses de 5 e 10 mg/kg, nesta ocasión non hai diferenzas significativas respecto ao grupo control.

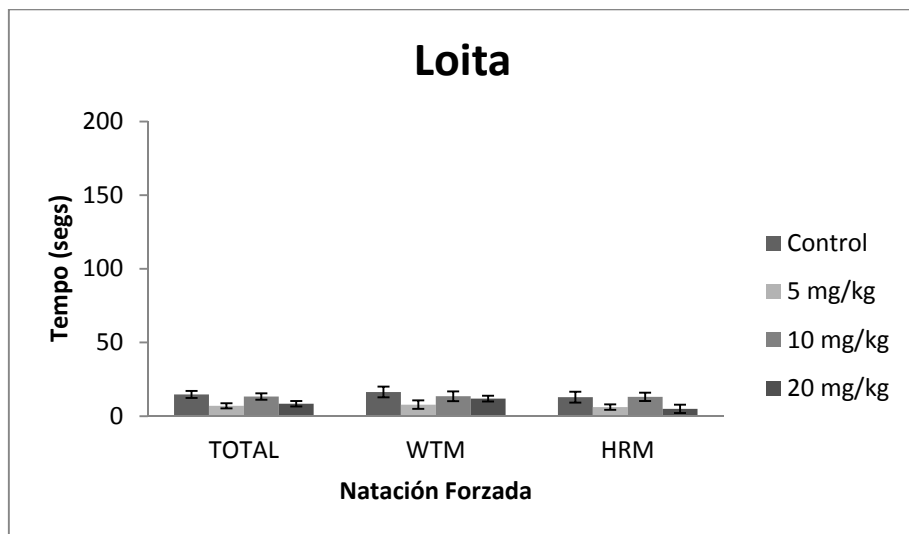
Finalmente, outra información extraída desta proba é o tempo de loita pero sen que esta implique desprazamento. Para este valor, e tal como vemos na gráfica 3, non parece que exista ningún tipo de efecto tanto dependente da dose de CORT como do xenotipo de cada grupo de animais. Neste caso todos os valores de $p > 0,083$. O tempo que dedican á loita é mínimo e non se detectan diferenzas significativas entre os grupos. Aplicando unha ANOVA dunha vía para cada os resultados obtidos por cada grupo de xenotipo de novo vemos que non hai diferenzas significativas neste aspecto do comportamento.



Gráfica 1: Representación gráfica do tempo que os animais están inmóbiles. Aplicamos unha ANOVA de dúas vías aos valores totais. Existe un efecto principal da dose sobre o xenotipo. Aplicamos unha ANOVA dunha vía aos valores de WTM e HRM, as diferenzas significativas presentan valores de $p < 0,05$.



Gráfica 2: O tempo que están nadando representado en segundos. Aplicamos unha ANOVA de dúas vías aos valores totais, onde vemos que o factor primordial é a dose de CORT que causa unha redución no tempo de natación. Coa ANOVA dunha vía vemos que os HRM presentan unha redución significativa no tempo de natación no grupo de 20 mg/kg respecto ás doses menores. Para todas as diferenzas significativas os valores de $p < 0,05$.



Gráfica 3: Representación do tempo que os animais teñen un comportamento de loita. Non hai ningunha diferenza entre doses ou entre xenotipos para este factor do comportamento. Neste caso todos os valores de $p > 0,05$.

TEST DE CAMPO ABERTO

Con esta proba situamos o animal nun espazo descoñecido para el e analizamos o seu nivel de exploración e se presenta ansiedade.

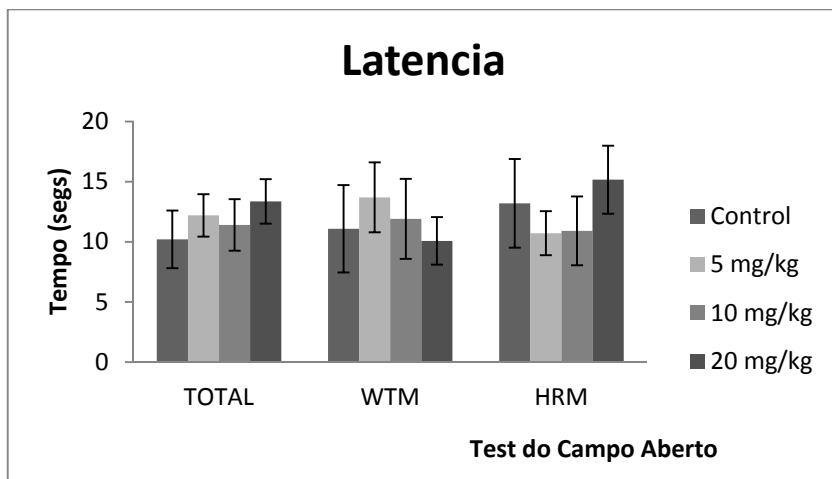
Esta proba está composta de diversos apartados nos que se pormenorizará para a posterior análise. Estes apartados son: o tempo que tarda en deixar o centro do campo aberto, o tempo que permanece no centro, o tempo que está na periferia e a distancia total camiñada.

Na gráfica 4 analizamos o tempo que tardan en deixar o centro da área, ou latencia, mediante unha ANOVA de dúas vías. Neste punto non se observan efectos nin da dose de CORT administrada nin do xenotipo de cada grupo nin tampouco existe unha interacción significativa entre xenotipo e dose de CORT. Todos os valores de $p > 0,23$. Coa ANOVA dunha vía confirmamos que tanto o grupo dos WTM como o dos HRM, non presentan ningunha diferenza significativa neste comportamento con calquera das doses de CORT administradas, en todos os casos os valores de $p > 0,246$.

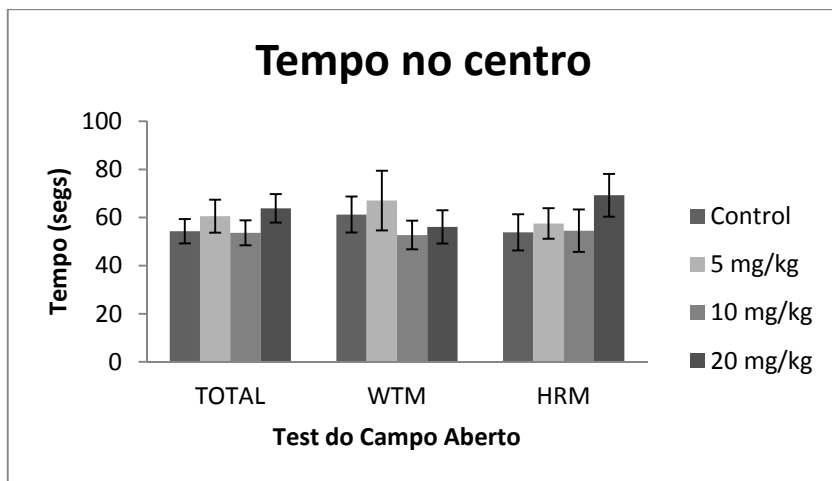
O outro punto analizado é o tempo que están no centro do campo aberto e obsérvanse resultados iguais ao punto anterior, é dicir, non hai efecto nin da dose de CORT nin do xenotipo nin interacción entre ambos, para estes casos $p > 0,246$. O mesmo ocorre cando se aplica a análise estatística para os resultados dos WTM e dos HRM. Estes datos están representados na gráfica 5.

Outro apartado que se analiza dentro deste comportamento é o tempo que dedican os animais a camiñar pola área considerada a periferia. De novo aplicouse unha ANOVA de dúas vías, pero ao igual que ocorría no anterior punto, non se ve unha influencia principal nin do xenotipo nin da dose de CORT. Coa ANOVA dunha vía, tampouco se detectan diferenzas para cada xenotipo. Isto vémosto na gráfica 6.

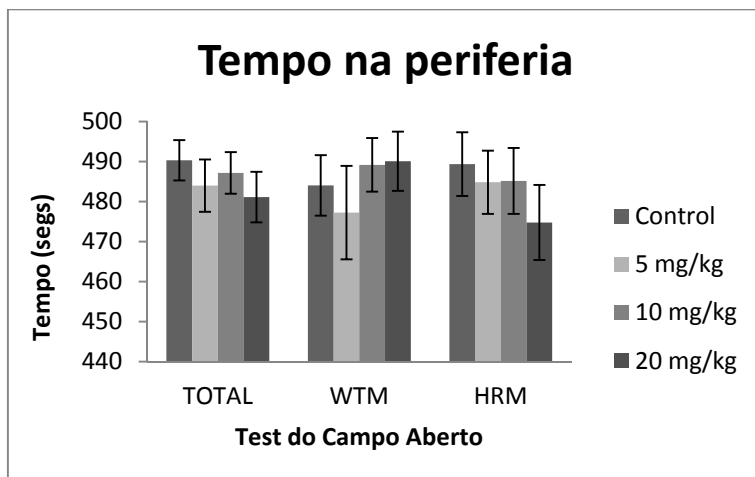
A análise do tempo total dedicado ao movemento represéntase na gráfica 7, nela represéntanse os resultados da ANOVA de dúas vías e a dunha vía respectivamente. Podemos ver que en ningún dos casos se detecta efecto da CORT ou do xenotipo sobre este aspecto do comportamento.



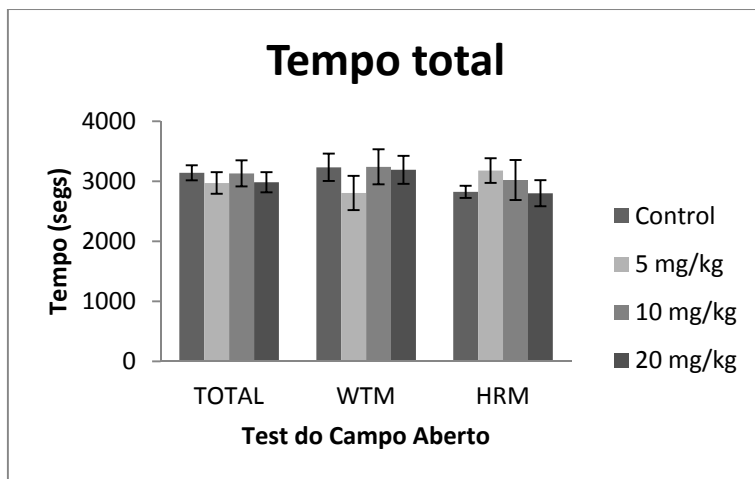
Gráfica 4: Representación gráfica da latencia, que é o tempo que tarda o animal en abandonar o centro da área. A ANOVA de dúas vías non revelou diferenzas significativas. Nestes casos as $p > 0,05$.



Gráfica 5: Expresamos graficamente o tempo que os animais están no centro da área. Nin a ANOVA de dúas vías nin a dunha vía amosaron diferenzas significativas neste valor. Todos os valores de $p > 0,05$.



Gráfica 6: O tempo que os animais dedican a explorar na periferia. As análises estatísticas non amosan diferenzas significativas para este comportamento. Os valores de $p > 0,05$.

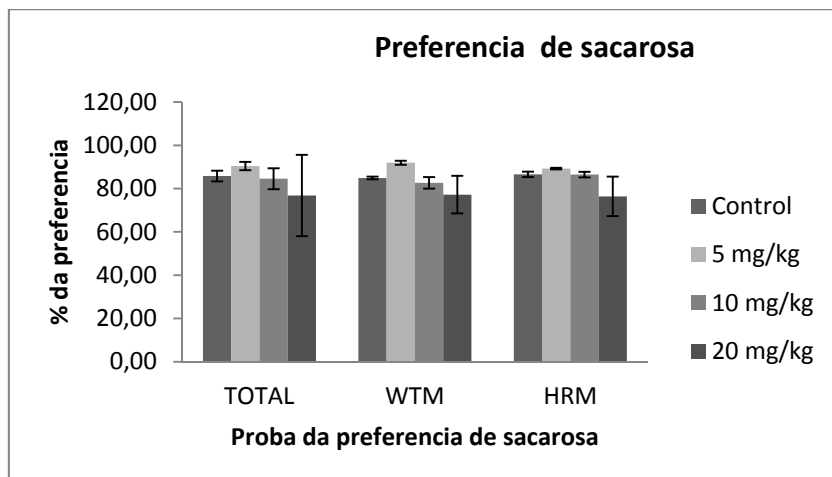


Gráfica 7: Representación gráfica do tempo total que os animais están a moverse. Tampouco se observan cambios significativos neste apartado, os valores de $p > 0,05$.

PROBA DE PREFERENCIA DE SACAROSA

Con esta proba testamos a capacidade dos animais para gozar dun estímulo pracenteiro, dándolles a saborear unha bebida doce. Conforme se explicou no material e métodos, a cada rato daráselle a escoller unha botella con auga con sacarosa e outra con auga normal. Tras un período de tempo especificado, cuantificaremos a cantidade de auga con sacarosa consumida respecto ao total de líquido ingerido, que nos dará o valor da preferencia. Un valor de preferencia inferior do 65% de sacarosa sería considerado anhedonia segundo Strekalova e Steinbusch (2010).

Como podemos observar na gráfica 8 non existe un efecto da dose de CORT administrada nin do xenotipo nin tampouco existe unha interacción significativa entre ambos. Nesta gráfica tamén representamos os datos da preferencia de sacarosa por cada un dos xenotipos, detallando en función da dose de CORT que se lle administra. Ningún dos grupos de xenotipos, WTM e HRM, presentan un comportamento anhedónico, independentemente de cal sexa a dose inxectada para ambos casos. Todos os valores de $p > 0,05$.



Gráfica 8: Proba da preferencia de sacarosa. A ANOVA de dúas vías amosou que non hai un efecto primordial nin do xenotipo nin da dose de CORT administrada. Así mesmo, a ANOVA dunha vía amosou que non hai diferenzas dentro dos grupos. Os valores de $p > 0,05$.

1.3.- DISCUSIÓN

No noso estudo inxectamos diferentes doses de CORT durante 21 días a ratos WTM e ratos HRM. Acabado o tratamento sométense a probas de comportamento: a natación forzada, o test de campo aberto e estúdase a anhedonia.

Como xa se vira en ratas, as doses máis elevadas de CORT son as que causan un maior efecto sobre o comportamento (Johnson e cols., 2006) e estudos previos permitiron ver que a dose máis efectiva para tratar de simular un comportamento depresivo en ratos é a de 20 mg/kg de CORT, inxectada durante un período de 21 días (Zhao e cols., 2008b e 2009). Este tratamento xera alteracións significativas no comportamento dos animais cando se someten a probas validadas, como son a proba da natación forzada, o campo aberto ou a proba da suspensión da cola (Zhao e cols., 2008b e 2009).

Aínda que os HRM presentan diferenzas sutís a nivel de comportamento respecto aos WTM (Tueting e cols., 2006), os nosos resultados mostran que o efecto do xenotipo non é suficiente para xerar un comportamento semellante a depresivo. Non obstante, cando se estudan os efectos da CORT en cada un dos xenotipos, vemos que os HRM mostran unha vulnerabilidade dependente da dose de CORT que non se observa nos WTM. Na proba de natación forzada, o tempo de inmovilidade é maior nos HRM que recibiron a dose máis elevada, do mesmo xeito que o tempo de natación é menor. Estes resultados son

concordantes cos obtidos anteriormente en ratos (Zhao e cols., 2008b e 2009).

Está aceptado que a proba da natación forzada, reflicte o estado neuropsicológico e neuroquímico dos animais e, de feito, permite analizar a eficacia dos tratamentos antidepressivos, permitindo analizar con certo detalle o sistema de neurotransmisión afectado. Como xa se mencionou, desta proba extraíñense datos de diversos aspectos a analizar, sendo o principal e máis representativo, o tempo que permanecen os animais inmóbiles (Porsolt e cols., 1977; Page e cols., 1999). Ademais, viuse que a proba da natación forzada reflicte posibles alteracións nos niveis de BDNF, os cales se reducen co incremento de CORT (Shirayama e cols., 2002; Sen e cols., 2008). Este factor neurotrófico xoga un papel moi importante nos procesos de plasticidade sináptica e tamén na neuroxénese, e a reelina actúa promovendo estes procesos a través de diversos cadoiros sinápticos, os cales teñen unha acción positiva sobre a expresión da BDNF. Así mesmo, sábese que os elevados niveis de CORT afectan aos sistemas de neurotransmisión (Herman e cols., 2003), a CORT altera o funcionamento e a expresión dos receptores de serotonina 1A e 2A (Karten e cols., 1999), do mesmo xeito, noutros traballos confírmase que existe unha redución na expresión da TH, encima limitante na síntese de DA e de noradrenalina (NA). A proba da natación forzada permite detectar este tipo de anomalías descritas: a redución no tempo de natación está reflicindo alteracións no sistema dopaminérxico e o incremento no tempo de inmovilidade está

relacionado cun mal funcionamento do sistema serotoninérxico (Page e cols., 1999). Estes sistemas están claramente relacionados coa depresión e son diana de tratamentos médicos (Wong e cols., 2000; Zhao e cols., 2008b).

Sabemos que a reelina participa nos procesos de maduración dos receptores NMDA propiciando o intercambio da subunidade NR2B pola subunidade NR2A (Groc e cols., 2007; Qiu e Weeber, 2007); a subunidade NR2B sobreexpresase baixo unha situación de estrés crónico e a inhibición de dita subunidade prevén déficits no comportamento (Teixeira e cols., 2011).

Nos HRM, estes déficits motivados polo incremento de CORT vense agravados pola menor expresión de reelina. Nestes animais *per se*, existe unha redución na expresión do encima TH, así como alteración na expresión dos receptores para a DA, unha redución na expresión dos receptores D2 e un incremento dos D3 (Tueting e cols., 2006). Non se detectaron, non obstante, alteracións no sistema serotoninérxico cando se cuantifica a expresión do transportador de serotonina (SERT) no núcleo rafe (Nullmeier e cols., 2010), aínda que viuse que a nivel do sistema inmunolóxico hai unha diminución na densidade da expresión de SERT, así como na súa distribución nas balsas lipídicas presentes na membrana dos linfocitos (Rivera-Baltanás e cols., 2010).

Poderíamos considerar que neste modelo animal conflúen os eventos ambientais e os eventos xenéticos cuxa combinación podería resultar en depresión ou outros trastornos psiquiátricos. Recentemente

viuse que animais mutantes que sobreexpresan reelina aos que á súa vez se lles inxectou CORT, amosan un comportamento na proba da natación forzada comparable ao dos WTM (Teixeira e cols., 2011).

Ca proba de campo aberto analizamos a ansiedade dos animais ao ser situados nun ambiente novo, así como a súa capacidade locomotora. Estes mesmos animais sometidos ao test do campo aberto non amosan diferenzas significativas polo que non podemos dicir que existan alteracións do comportamento motor ou da súa capacidade de exploración. Isto mesmo xa se tiña observado en ratas, que tamén recibiron un tratamento de doses elevadas de CORT durante o mesmo período de tempo (Gregus e cols., 2005; Marks e cols., 2009). Podemos descartar a posibilidade de atrofia muscular posto que, a diferenza do que ocorre coas ratas, estes animais non perden peso coa administración de CORT. Estudos realizados con ratos amosan o mesmo resultado nesta proba de comportamento, aínda incluso cando se manipulan para obter unha sobreexpresión de reelina e/ou ademais se lles inxecta CORT (Zhao e cols., 2008b; Teixeira e cols., 2011).

Respecto ao estudo da anhedonia, empregamos o mesmo criterio empregado por Strekalova e Steinbusch, (2010) para establecer cando se está dando un comportamento anhedónico. No noso experimento non se detectaron indicios de anhedonia en ningún dos grupos, tanto comparando entre xenotipos como cando se lles administra CORT. O pracer está controlado por unha diversa e complexa rede de conexións e

áreas cerebrais, polo que a falta de alteracións neste aspecto pode estar indicando que os danos causados non son suficientes como para simular este comportamento. Facer este tipo de estudos con ratos resulta máis complexo do que resulta facelo con ratas, posto que estas son máis homoxéneas no seu comportamento en canto a condicións e concentracións de sacarosa (D'Aquila e cols., 1997; Zhao e cols., 2008b). Os ratos amosan unha elevada variabilidade entre as distintas cepas polo que se fai máis difícil deseñar un protocolo común para todas elas (Pothion e cols., 2004; Dalm e cols., 2009; Strekalova e Steinbusch, 2010).

En pacientes con depresión e outros trastornos psiquiátricos como esquizofrenia, viuse unha redución no número de células que expresan reelina (Fatemi e cols., 2000), se ben é certo que son precisos máis estudos para poder determinar a natureza das células reelina positivas danadas. Poderíase analizar en detalle a neuroxénese, para ver as posibles alteracións aos distintos niveis do proceso. Parece claro que estas células poden ter un papel nos importantes procesos que se levan a cabo no hipocampo, como a memoria de traballo e procesos de aprendizaxe. Polo que parecen indicar estes resultados, a reelina confire un factor de vulnerabilidade fronte á administración de CORT, de tal xeito que a redución da reelina tanto debido a unha causa xenética ou a unha regulación epixenética, podería estar xogando un papel importante na hipótese dos dous *hits*. Neste aspecto fanse necesarios máis estudos a nivel da expresión da reelina, para poder analizar en detalle a alteración

da proteína especialmente en depresión, onde a redución non parece tan clara como noutras enfermidades. É necesario ter en consideración as dificultades técnicas de traballar con esta proteína, a cal parece sensible a factores como o período *postmortem* ou ao almacenamento (Guidotti e cols., 2000; Fatemi e cols., 2000 e 2005). Por outra banda, recentemente viuse que a administración de fármacos psicotrópicos tal como a fluoxetina ou antipsicóticos atípicos, como a olanzapina, causan un incremento nos niveis de reelina, non obstante, antipsicóticos típicos como o haloperidol, parécena diminuír (Fatemi e cols., 2005). Tal vez deberíamos contextualizar os nosos datos tendo en conta os coñecementos actuais sobre a depresión e a reelina, interpretando a depresión como un síntoma da fase prodrómica da esquizofrenia (Hafner e cols., 2005). Considerando isto, poderíamos dicir que un déficit na expresión de reelina durante o desenvolvemento podería supoñer un factor de risco para padecer algún destes trastornos mentais, ou podería explicar síntomas observados ao longo da evolución e do desenvolvemento destas enfermidades. Non obstante, son necesarios máis estudos a nivel de comportamento e ampliar a análise a nivel neuroquímico e neurobiolóxico para poder ter un coñecemento máis detallado da natureza das alteracións observadas e das súas implicacións.

Capítulo 2

Estudo dos efectos da administración de
corticosterona sobre a neuroxénese e as células
reelina positivas



2.1.- INTRODUCCIÓN

Sábese que a depresión e a esquizofrenia teñen unha porcentaxe de herdabilidade de entre o 30 e o 50%, esta base xenética aporta maior sensibilidade fronte a procesos ambientais estresantes (Fava e Kendler, 2000; Levinson, 2006). O coñecemento desta dualidade causal, unha base xenética e unha base ambiental, fixo que se formulase a hipótese dos dous *hits*. Esta hipótese propón unha primeira base biolóxica, que explica que durante o desenvolvemento embrionario poderían ocorrer alteracións de mecanismos xenéticos, as cales serían duradeiras no tempo; e por outra banda, unha base psicosocial durante a vida adulta onde as alteracións biolóxicas que tiveron lugar durante o desenvolvemento supoñen unha maior susceptibilidade ante calquera perturbación ou situación anómala, o que podería levar finalmente ao desenvolvemento da enfermidade (Maynard e cols., 2001).

Durante o desenvolvemento, a proteína reelina aparece expresada polas células de Cajal-Retzius participando na organización das áreas laminadas cerebrais (Tissir e Goffinet, 2003), durante a vida adulta aparece expresada por interneuronas GABAérxicas distribuídas polo córtex e o hipocampo (Alcántara e cols., 1998 e 2006; Abraham e Meyer, 2003). Como xa se mencionou con anterioridade, o papel da reelina durante a vida adulta é fundamental para procesos de neuroxénese e sinaptoxénese (Rodríguez e cols., 2000; Liu e cols., 2001; Pujadas e cols., 2010).

A maior parte das funcións nas que participa a proteína reelina están alteradas na esquizofrenia, trastorno bipolar e depresión. Os estudos

iniciais realizados polo Dr. Erminio Costa, na Universidade de Illinois, Chicago, demostraron que efectivamente, os pacientes con estas enfermidades psiquiátricas amosaban unha redución da proteína reelina (Impagnatiello e cols., 1998; Guidotti e cols., 2000). Traballos posteriores confirmaron dita redución en áreas cerebrais como o hipocampo, córtex e cerebelo, en pacientes con esquizofrenia e trastorno bipolar (Impagnatiello e cols., 1998; Fatemi e cols., 2000; Eastwood e Harrison, 2006). Non obstante, esta alteración á baixa na expresión de reelina non só se observa en pacientes con esquizofrenia, senón que tamén se puido detectar en pacientes con depresión (Fatemi e cols., 2000; Knable e cols., 2004).

No capítulo anterior comprobamos que os ratos HRM son máis vulnerables fronte aos efectos depresoxénicos da CORT e presentan un comportamento semellante ao depresivo, a diferenza dos animais que expresan o 100% de reelina. Estudos previos realizados con ratas amosaron que a CORT causa unha redución no número de células reelina positivas na SGZ do xiro dentado (Lussier e cols., 2009). Estas ratas que recibiron CORT tamén presentan un comportamento semellante ao depresivo, polo que se especula que os HRM tamén amosarían unha maior alteración no número de células reelina positivas dada a súa base xenética. Así mesmo, tamén se estuda o efecto sobre a neuroxénese dada a influencia da CORT e da reelina sobre a mesma mediante a análise do número de células que están formadas de novo e que expresan DCX, así mesmo tamén se estudará o grado de maduración destas novas neuronas analizando o grado de complexidade da arborización dendrítica (Joon Won e cols., 2006; Brummelte e Galea, 2010).

Este estudo realizouse tal e como se explica no grupo experimental 2 de material e métodos e no apartado correspondente de procedementos.

2.2- RESULTADOS

Os datos obtidos da cuantificación da DCX analizáronse nun primeiro momento cunha ANOVA de dúas vías coa fin de analizar que factor ten maior peso sobre as alteracións observadas, a dose de CORT inxectada ou o xenotipo de cada animal. Tal e como podemos observar na gráfica 1, hai un efecto primordial da dose de CORT [$F(3, 48)=7,711$, $p<0,001$] sobre o número de células que expresan DCX, mentres que o xenotipo non ten un efecto significativo sobre estas células [$F(1, 48)=0,211$, $p>0,64$], así mesmo, non hai interacción significativa da dose de CORT co xenotipo [$F(3, 48)=0,750$, $p>0,52$]. Hai unha redución en xeral do número de células DCX positivas co aumento da dose de CORT. O grupo de animais control amosan un maior número de células formadas de novo respecto aos grupos que recibiron unha dose de 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg. Estas diferenzas son estatisticamente significativas, $p<0,05$. Así mesmo, a dose de 5 mg/kg tamén amosa un número de células DCX positivas significativamente maior que o grupo que recibiu a maior dose de CORT. Unha análise máis pormenorizada cunha ANOVA dunha vía, amosa que estas diferenzas observadas no total son debidas a que existen alteracións significativas dentro do grupo dos HRM, estes datos tamén os vemos na gráfica 1 [$F(3, 23)=9,133$,

$p < 0,001$]. Dentro dos HRM, os animais con doses de 5 mg/kg e de 10 mg/kg teñen máis células DCX positivas cós inxectados con 20mg/kg. Dentro do grupo de ratos WTM, existe unha tendencia á redución no número de células formadas de novo co aumento da dose de CORT, non obstante, dita tendencia non é significativa, $[F(3, 23)=1,587, p > 0,22]$.

Na figura 1 podemos ver imaxes do representado estatisticamente, claramente existe un efecto da dose de CORT sobre a neuroxénese e este efecto é máis importante nos HRM que nos animais WTM. Nos animais pertencentes ao grupo control podemos ver gran número de células DCX positivas con ramificacións complexas que se estenden pola capa granular, non obstante, co incremento da dose de CORT o número de células é menor, aumentan os espazos baleiros entre elas e as ramificacións son máis pobres, ademais vemos que este efecto da dose de CORT é máis severo nos HRM.

Dentro da análise da neuroxénese tamén estudamos o desenvolvemento e o nivel de arborización dendrítica das células que se están formando de novo. Para iso clasificámolas en 6 categorías especificadas en Plumpe e cols., (2006), podemos ver un exemplo da morfoloxía da célula e do grao de arborización correspondente a cada categoría na figura 2.

Aplicamos unha ANOVA de dúas vías para analizar o factor con maior influencia sobre o nivel de desenvolvemento das células. Dentro da categoría 1, a ANOVA de dúas vías confirma que existe un efecto principal da dose de CORT inxectada $[F(3, 45)=11,166, p < 0,001]$ pero non hai un efecto significativo do xenotipo $[F(1, 45)=0,294, p > 0,59]$.

Tampouco existe unha interacción entre o xenotipo e a dose de CORT administrada [$F(3, 45)=0,659$, $p>0,58$]. Na gráfica 2 vemos os resultados das análises *post-hoc*, amosan que o grupo de animais inxectados con 20 mg/kg presentan significativamente un maior número de células correspondentes á categoría 1 con respecto aos grupos inxectados con menores doses de CORT e ao grupo control. O grupo control tamén amosa diferenzas significativas con respecto ao grupo que recibiu 10 mg/kg de CORT. Cunha ANOVA dunha vía podemos analizar detalladamente o que ocorre dentro de cada grupo de xenotipo. Como podemos ver tamén na gráfica 2, os ratos WTM pertencentes ao grupo control e ao grupo coa dose menor de CORT, 5 mg/kg, presentan un menor número de células da categoría 1 cós grupos con doses maiores, 10 mg/kg e 20 mg/kg. Esta diferenza ten un nivel de significación de $p<0,05$. Dentro do grupo dos HRM, os animais inxectados coa maior dose de CORT teñen un maior número de células correspondentes á categoría 1 que calquera dos outros grupos.

As gráficas 3 e 4 representan os datos obtidos para a análise do número de células correspondentes ás categorías 2 e 3. Dentro da categoría 2 podemos observar un lixeiro incremento no número de células no grupo de animais que recibiu a dose máis elevada de CORT, pero en calquera caso, estas diferenzas non son estatisticamente significativas. Na categoría 3 non hai diferenzas detectables entre os animais con distintas doses así como dentro dos xenotipos.

Na gráfica 5 exprésanse os datos correspondentes á categoría 4, que son células que presentan unha árbore dendrítica levemente

ramificada. A ANOVA de dúas vías demostra que existe unha redución significativa da porcentaxe de células desta categoría co incremento da dose de CORT [$F(3, 45)=4,727$, $p<0,007$] mentres que o xenotipo non ten efecto significativo [$F(1, 45)=1,651$, $p>0,207$], tampouco existe unha interacción da dose de CORT sobre o xenotipo [$F(3, 45)=0,468$, $p>0,707$]. Na gráfica 5 podemos ver que existe unha diferenza significativa entre os individuos control e a dose menor, 5 mg/kg, respecto aos individuos que recibiron 20 mg/kg. Detalladamente en cada xenotipo, vemos que os WTM só presentan unha tendencia semellante á descrita na visión global, pero non é estatisticamente representativa, non obstante nos HRM confirmamos as diferenzas que se detectaron coa ANOVA de dúas vías.

Na gráfica 6 analizamos en detalle a porcentaxe de células que se encadran na categoría 5, que son aquelas que xa teñen unha morfoloxía ben desenvolta. A ANOVA de dúas vías mostra que sobre este tipo de células a dose de CORT ten un efecto significativo, como xa se viña describindo para as categorías anteriores, [$F(3, 45)=4,962$, $p<0,005$], non obstante, non hai efectos significativos do xenotipo [$F(1, 45)=0,001$, $p>0,987$] e tampouco hai unha interacción significativa entre a dose de CORT e o xenotipo [$F(3, 45)=0,06$, $p>0,981$]. Coa análise da ANOVA de dúas vías vemos que hai unha redución significativa da porcentaxe de células desta categoría, nos ratos que recibiron CORT respecto aos ratos do grupo control. A análise coa ANOVA dunha vía, confirma que estas diferenzas significativas son debidas ao que sucede dentro do grupo dos HRM, que amosan maior vulnerabilidade fronte á CORT, especialmente

a altas doses, que presentan unha menor porcentaxe de células da categoría 5 cós individuos control ou a dose menor de CORT, 5 mg/kg.

Finalmente na gráfica 7, expresamos a porcentaxe de células DCX positivas que estarían clasificadas na categoría 6, que son aquelas nas que a arborización dendrítica é complexa e son células practicamente maduras. Neste grupo a ANOVA de dúas vías detectou un efecto significativo da dose de CORT [$F(3, 45)=7,077$, $p<0,001$], non hai efecto significativo do xenotipo [$F(1, 45)=0,001$, $p>0,987$], tampouco atopamos unha interacción significativa entre a dose de CORT e o xenotipo [$F(1, 45)=0,06$, $p>0,981$]. As análises *post-hoc* confirman que os animais que recibiron unha dose de 20 mg/kg presentan menor porcentaxe de células cós animais que recibiron doses menores ou cós animais do grupo control. Esta situación confírmase coa ANOVA dunha vía realizada no grupo dos HRM onde vemos que hai unha redución significativa da porcentaxe de células correspondentes á categoría 6 no grupo inxectado con 20 mg/kg. Os valores de $p<0,05$.

Con esta parte do estudo vemos que a CORT afecta á neuroxénese e ao grao de desenvolvemento que alcanzan as células, dado que os animais inxectados con maior dose de CORT non só son os que amosan un menor número de células formadas de novo, senón que tamén amosan unha redución no número de células totalmente maduras e integradas, o que xustifica que, ademais, son os que presentan un maior número de células con morfoloxía inmatura.

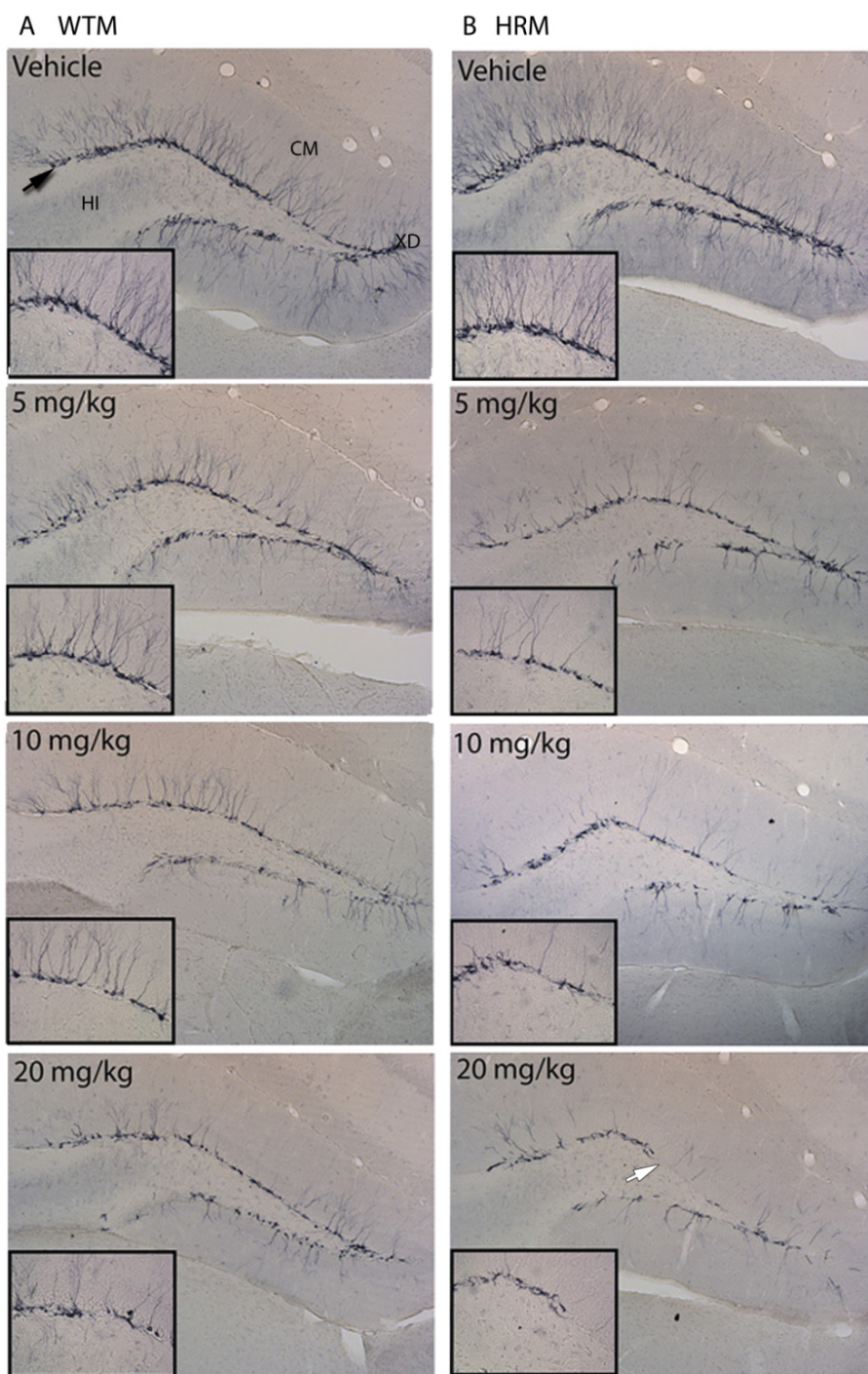


Figura 1: Expresión de DCX no xiro dentado. Na columna A presentamos detalles dos WTM e na columna B presentamos detalles dos HRM. Os animais do grupo control presentan maior número de células na SGZ (frecha negra) e cunha maior ramificación que esténdese na CM, namentres que os animais con maior dose de CORT presentan menor número de células, hai máis ocos entre elas (frecha branca) e as ramificacións dendríticas son máis pobres. XD: xiro dentado; CM:capa molecular; HI: *hilus*.

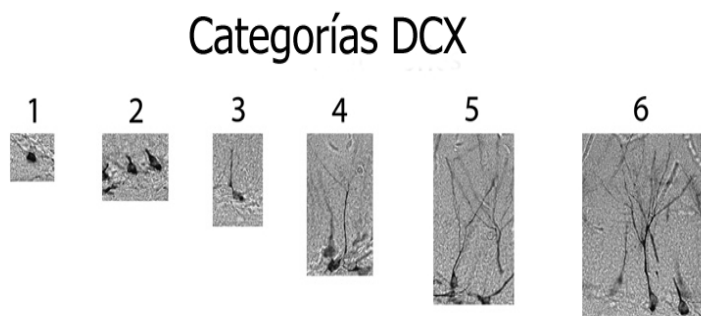
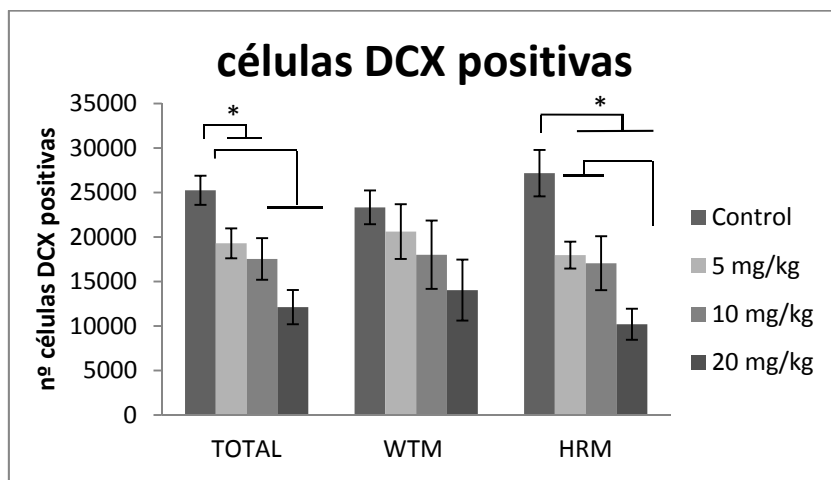
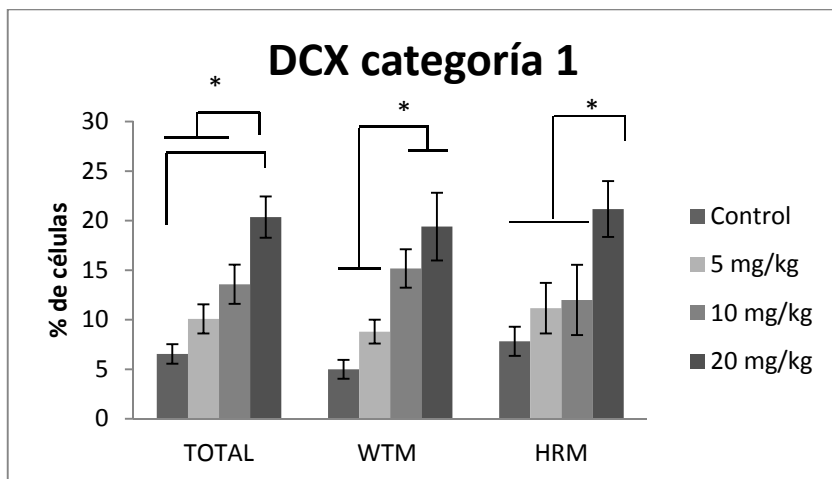


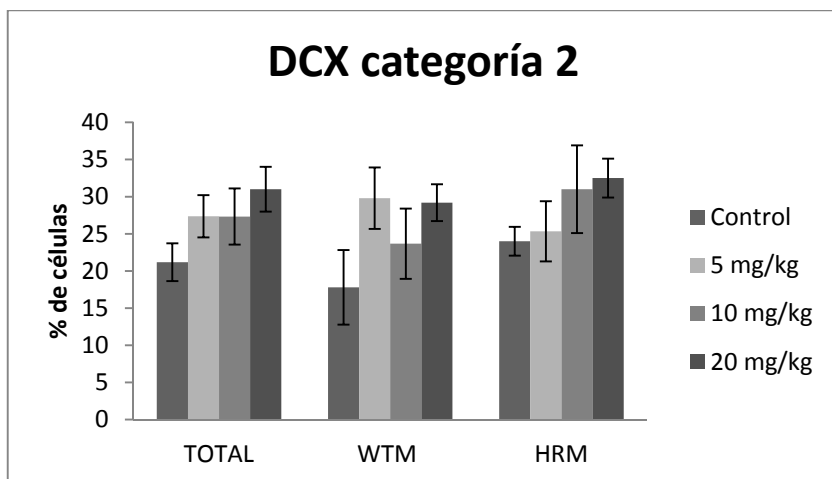
Figura 2: Esquema das categorías nas que se clasifican as células que expresan DCX en función da súa morfoloxía e desenvolvemento da árbore dendrítica segundo Plumpe e cols.,(2006).



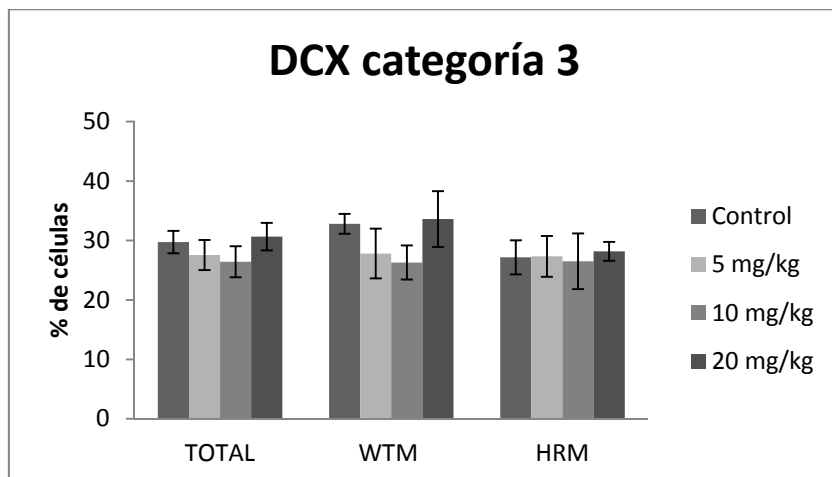
Gráfica 1: A ANOVA de dúas vías amosa que existen diferenzas significativas no número de células DCX positivas entre o grupo control e o grupo de 5 e 10 mg/kg de CORT e así mesmo entre o grupo control e o de 5 mg/kg e o grupo de 20 mg/kg. A ANOVA dunha vía mostra que no grupo dos HRM existen diferenzas significativas entre o grupo control e os grupos con CORT, así como entre os grupos que recibiron menor dose de CORT e o grupo que recibiu 20 mg/kg. Para estes casos os valores de $p < 0,05$.



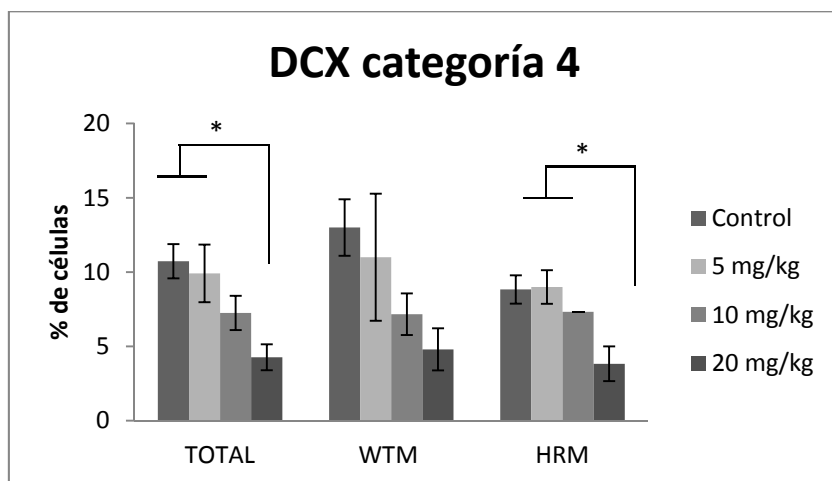
Gráfica 2: A ANOVA de dúas vías amosa que existe un efecto significativo da dose de CORT sobre o xenotipo. O grupo inxectado con 20 mg/kg de CORT presenta significativamente maior número de células desta categoría cós outros grupos de CORT e có grupo control.



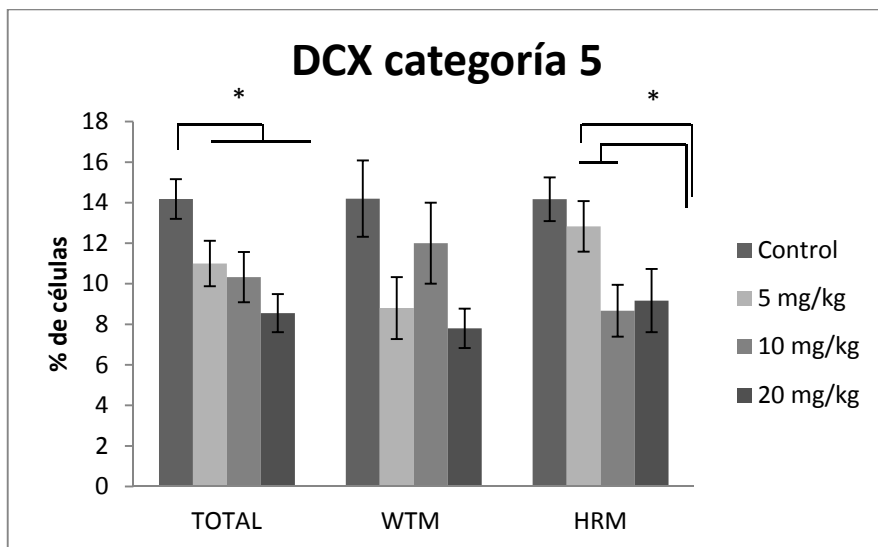
Gráfica 3: Representación da porcentaxe de células DCX positivas pertencente á categoría 2. Non se detectaron efectos significativos nin da dose de CORT nin do xenotipo, todos os valores de $p > 0,05$.



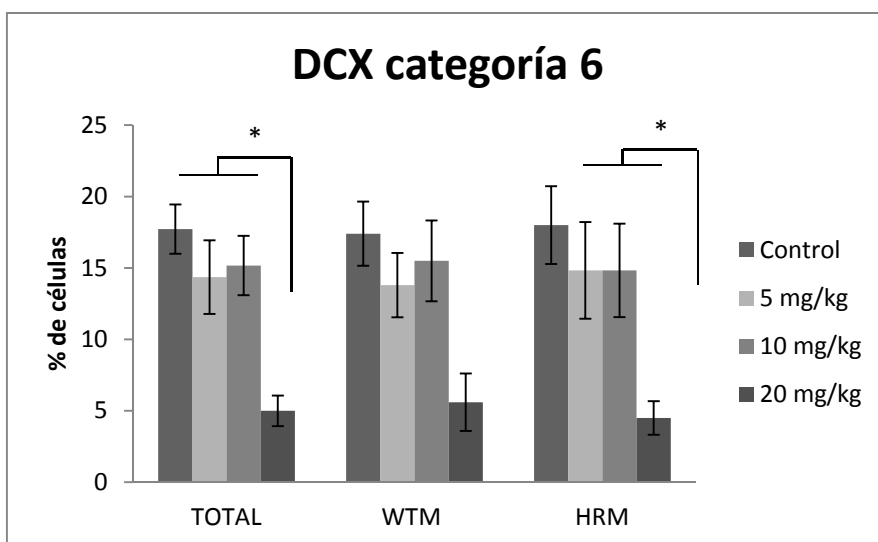
Gráfica 4: Representación das células pertencentes á categoría 3. As ANOVAs aplicadas non amosaron efectos significativos nin da dose de CORT nin do xenotipo sobre a porcentaxe de células desta categoría. Os valores de $p > 0,05$.



Gráfica 5: A ANOVA de dúas vías amosa un efecto da dose de CORT sobre a porcentaxe de células da categoría 4. O grupo control e o que recibiu unha dose de 5 mg/kg presentan un número de células maior có grupo que recibiu a dose de 20 mg/kg.



Gráfica 6: A ANOVA de dúas vías amosou un efecto significativo da dose de CORT sobre a porcentaxe de células DCX positivas pertencentes á categoría 5. As análises *post-hoc* demostraron que hai unha redución significativa nos grupos inxectados con CORT. A ANOVA dunha vía amosou que existe unha redución significativa desta categoría de células nos HRM especialmente nos que recibiron a dose de 20 mg/kg. Para as diferenzas significativas os valores $p < 0,05$.



Gráfica 7: Representación da porcentaxe de células correspondente á categoría 6. As análises estatísticas amosan unha redución significativa desta porcentaxe de células no grupo que recibiu a dose de 20 mg/kg. A ANOVA dunha vía confirma dita redución nos HRM. As diferenzas significativas presentan un valor de $p < 0,05$.

Outra parte deste traballo consiste en analizar se a CORT ten algún efecto sobre o número de células reelina positivas. Representamos na gráfica 8 os resultados correspondentes ao número de células reelina positivas presentes no SGZ. Aplicamos unha ANOVA de dúas vías coa que vemos que existe un efecto principal do xenotipo sobre o número de células reelina positivas [$F(1, 65)=9,569$, $p<0,003$], non existe un efecto significativo da dose de CORT [$F(3, 65)=1,557$, $p>0,21$], así mesmo tampouco existe un efecto significativo da interacción da dose de CORT co xenotipo [$F(3, 65)=1,299$, $p>0,28$].

Na gráfica 9 observamos o número de células reelina positivas no *hilus*, a ANOVA de dúas vías revela un efecto principal do xenotipo sobre o número de células que expresan reelina [$F(1, 65)=6,735$, $p<0,02$], ao igual que ocorre no SGZ non observamos un efecto significativo da dose de CORT [$F(3, 65)=2,116$, $p>0,10$] e tampouco existe una interacción estatisticamente significativa entre o efecto da dose de CORT e o xenotipo [$F(3, 65)=0,942$, $p>0,42$].

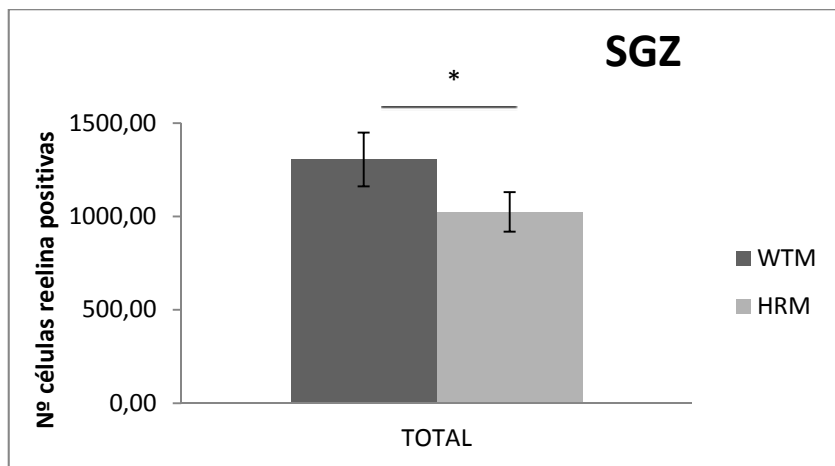
Na figura 3 podemos ver as imaxes da expresión de reelina no xiro dentado nos WTM e nos HRM e como varía o número de células reelina positivas segundo a dose de CORT inxectada. Parece que existe unha redución drástica no número de células reelina positivas no HRM e de forma especial nas doses de 10 mg/kg e de 20 mg/kg de CORT. Para confirmar este feito estatisticamente fixéronse comparacións do número de células entre ambos xenotipos e para cada dose. Aplicamos unha T-Student, a cal permite confirmar que existe unha diferenza

estatisticamente significativa no número de células reelina positivas entre os WTM e os HRM nas doses de 20 mg/kg e 10 mg/kg [20 mg/kg: $t(13)=2,188$, $p<0,03$; 10 mg/kg: $t(15)=2,557$, $p<0,02$]. Representamos estes datos na gráfica 10. En termos de porcentaxe, os HRM presentan unha redución do 43% e do 24% no número de células reelina positivas nos HRM inxectados con 20 mg/kg e 10 mg/kg de CORT, respectivamente. Así mesmo, tamén podemos atopar unha redución significativa no número de células que expresan reelina no *hilus* dos HRM inxectados con 20 mg/kg e con 10 mg/kg de CORT [20 mg/kg: $t(13)=2,684$, $p<0,01$; 10 mg/kg: $t(15)=1,791$, $p<0,05$]. Estamos a falar dunha redución dun 33% e dun 15% no número de células que expresan reelina no *hilus* dos HRM inxectados con 20 mg/kg e 10mg/kg respectivamente. Os resultados correspondentes ao *hilus* vémoslos representados na gráfica 11.

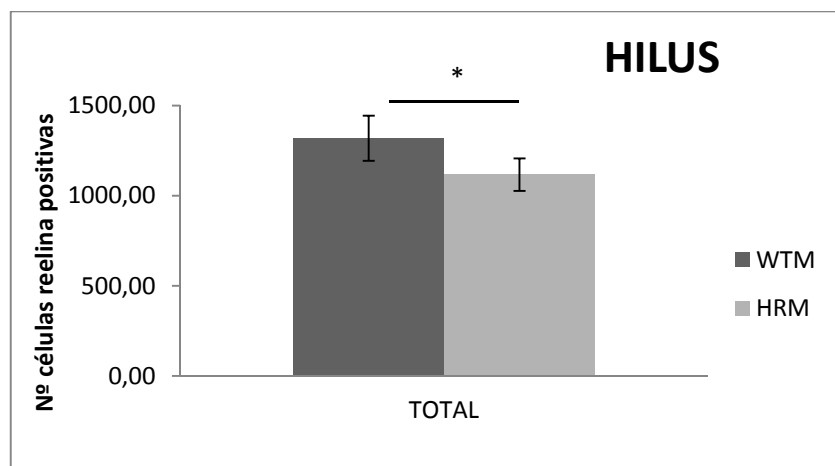
Aplicamos a ANOVA dunha vía para ver o efecto da dose de CORT dentro de cada xenotipo e só nos HRM atopamos un efecto significativo da mesma sobre o número de células reelina presentes no SGZ e no *hilus*, [SGZ: $F(3, 29)=4,20$, $p<0,02$; *hilus*: $F(3, 29)=4,42$, $p<0,02$]. Podemos ver unha representación do mencionado nas gráficas 12 e 13. As probas *post-hoc* mostran que os HRM inxectados con 20 mg/kg presentan significativamente menos células que expresan reelina no SGZ e no *hilus* cós HRM inxectados con 5 mg/kg ou con control. Para estes casos os valores de $p<0,05$. En termos prácticos podemos dicir que os HRM que recibiron 20 mg/kg presentan un 38% menos de células con reelina cós HRM do grupo control, e un 35% menos cós do grupo que

recibiron 5 mg/kg. No *hilus* os HRM inxectados con 20 mg/kg teñen un 31% e un 33% menos de células con reelina cós animais inxectados con control e 5 mg/kg, respectivamente.

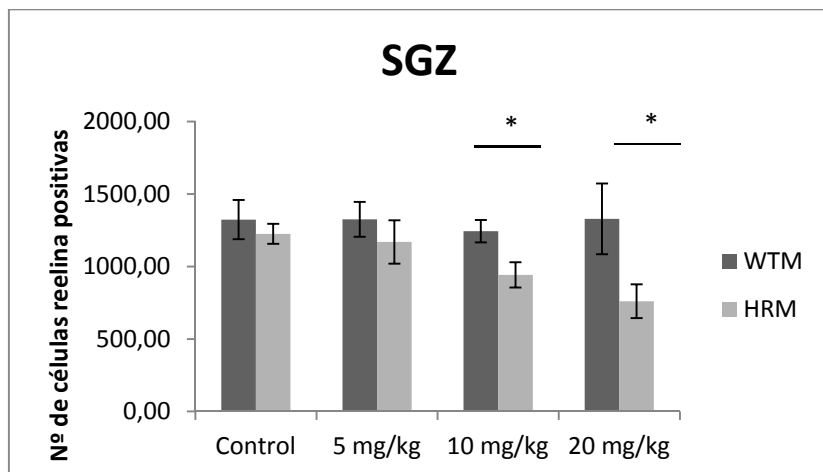
No WTM a ANOVA dunha vía non revelou diferenzas significativas no número de células reelina positivas nos animais pertencentes aos distintos grupos de doses de CORT e ao grupo control. Neste caso os valores de $p > 0,05$. Os datos tamén están representados nas gráficas 12 e 13.



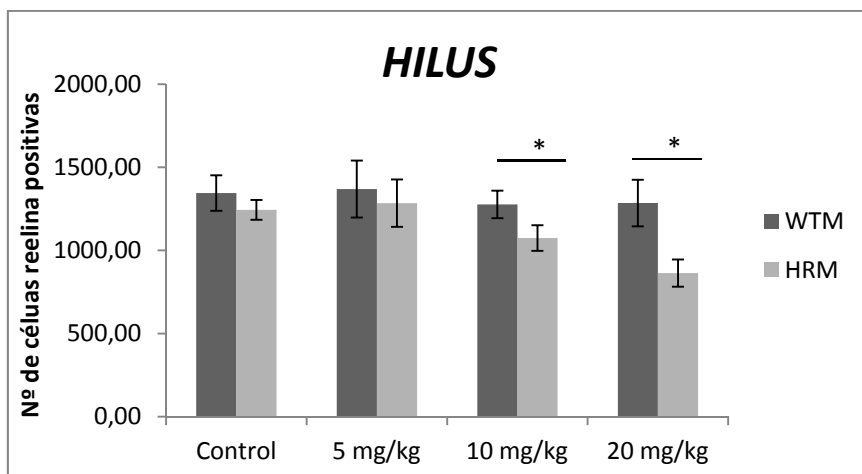
Gráfica 8: A ANOVA de dúas vías amosou un claro efecto do xenotipo sobre o número de células que expresan reelina presentes no SGZ. O valor de $p < 0,05$.



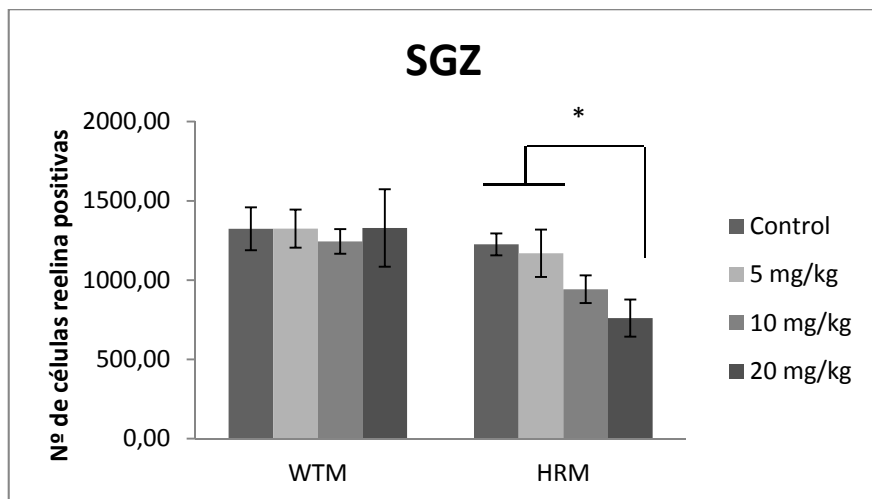
Gráfica 9: Representación gráfica das células reelina positivas cuantificadas no *hilus*. A ANOVA de dúas vías amosou un efecto significativo do xenotipo. Os valores de $p < 0,05$.



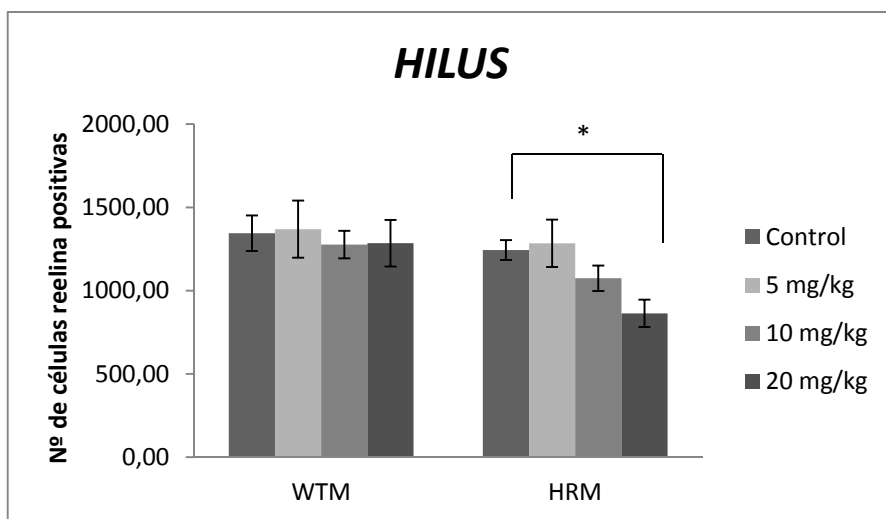
Gráfica 10: Existe un claro efecto do xenotipo sobre o número de células reelina positivas. Nos HRM inxectados con 10 mg/kg e 20 mg/kg de CORT atopamos unha redución significativa no número de células que expresan reelina. Para estes datos a T-Student presenta uns valores de $p < 0,05$.



Gráfica 11: Representación gráfica dos resultados obtidos coa T-Student. Existe unha redución significativa no número de células reelina positivas que presentan os HRM que recibiron as doses maiores de CORT, 10 mg/kg e 20 mg/kg.



Gráfica 12: Representación do efecto das diferentes doses de CORT sobre o número de células reelina positivas localizadas na SGZ, comparando entre WTM e os HRM. A ANOVA dunha vía mostrou unha redución significativa no número de células reelina positivas nos HRM do grupo control e nos do grupo de 5 mg/kg respecto ao grupo que recibiron 20 mg/kg. Para as diferenzas significativas os valores de $p < 0,05$.



Gráfica 13: Representación gráfica dos resultados obtidos pola ANOVA dunha vía, na que vemos unha redución significativa no número de células que expresan reelina presentes no *hilus* dos HRM cando se lles administra a dose máis alta de CORT.

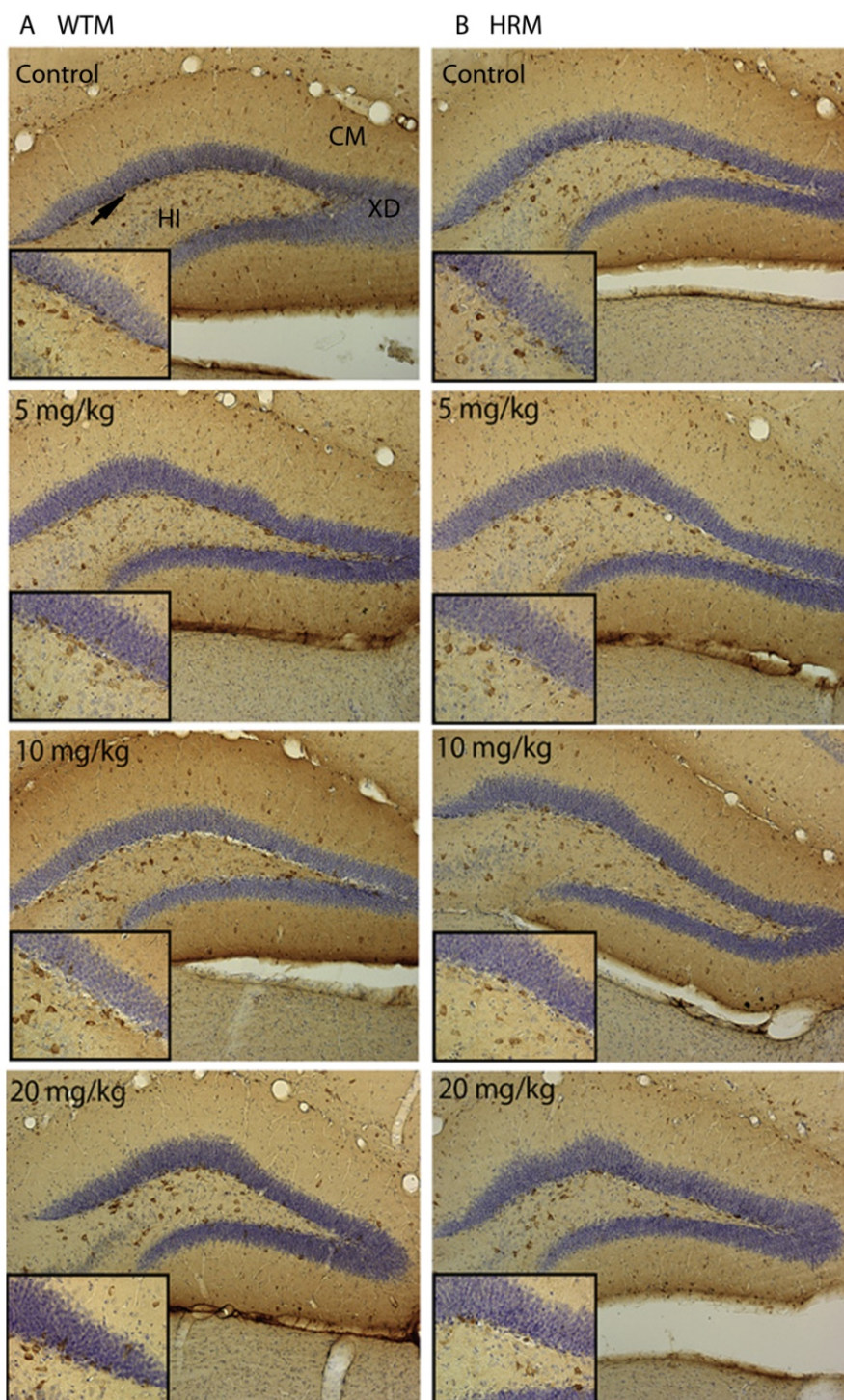


Figura 3: Expresión de reelina nas células piramidais en cesto localizadas na SGZ (frecha) e tamén en interneuronas situadas no *hilus*. Existe unha redución dependente do xenotipo nos HRM respecto aos WTM, e así mesmo podemos observar unha maior vulnerabilidade dos HRM fronte ás doses máis elevadas de CORT xa que apréciase unha clara redución no número de células reelina positivas.

2.3.- DISCUSIÓN

Datos previos amosaron que a exposición crónica a un suceso estresante como a restrición de movementos ou a administración crónica de CORT teñen un efecto negativo sobre a neuroxénese, a proliferación e a diferenciación das células que se forman de novo. De feito estes estudos previos amosaron que os elevados niveis de CORT en ratas diminúe significativamente a porcentaxe de células que se forman de novo e que se diferencian en neuronas, pero non así as células que se diferencian en glía; tamén se observou que os elevados niveis de CORT dan lugar á aparición dunha poboación de células proxenitoras pero que non teñen un xenotipo diferenciado (Pham e cols., 2003; Wong e Herbert ,2004 e 2006; Brummelte e Galea, 2010). Non obstante, a maiores, os nosos resultados mostran que a CORT incluso a dose de 5 mg/kg ten unha influencia negativa sobre a supervivencia das neuronas que se forman de novo no SGZ e no grao de arborización dendrítica, así, nos animais inxectados con CORT observamos unha alta porcentaxe de neuronas DCX positivas cunha árbore dendrítica pobre ou nula, mentres que nos animais que pertencen ao grupo control atopamos unha maior porcentaxe de células DCX positivas e estas presentan unha arborización dendrítica complexa e extensa.

Os elevados niveis de CORT poderían supoñer un sinal de parada nos procesos de diferenciación e poderían estar alterando as vías polas que se regula a supervivencia das novas células, así como a

diferenciación das mesmas (Wong e Herbert, 2004 e 2006). O efecto da CORT sobre a neuroxénese podería ser tanto directo como indirecto. Durante o período de proliferación a acción negativa da CORT sería indirecta posto que moi poucas células proxenitoras expresan receptores de glicocorticoides, deste xeito a CORT podería influír sobre a neuroxénese actuando sobre as neuronas veciñas das formadas de novo (Wong e Herbert, 2006). Unha posible acción da CORT sería a través dos receptores NMDA dos que se coñece a súa acción negativa sobre a neuroxénese, dado que en situacións de estrés están sobreactivados (McEwen, 1999; Balu e Lucki, 2008; Tse e cols., 2011; Schoenfeld e Gould, 2012). Outro mecanismo sería a través do BDNF, do factor de crecemento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) ou tamén outros factores como o factor de crecemento semellante á insulina-1 (*Insulin-like growth factor-1*, IGF-1) ou o EGF, posto que o estrés crónico reduce a expresión destes factores neurotróficos necesarios para promover a neuroxénese (Wong e Herbert, 2006; Sen e cols., 2008; Fournier e Duman, 2012; Schoenfeld e Gould, 2012).

Os nosos resultados amosan que todas as doses de CORT causan unha redución significativa no número de células DCX positivas, non obstante, se temos en conta os resultados obtidos a nivel de comportamento para estes mesmos animais só a maior dose de CORT, 20 mg/kg, provoca un incremento estatisticamente significativo no tempo de inmovilidade na proba da natación forzada. Isto podería suxerir que os efectos da CORT sobre a proliferación celular, a

supervivencia celular e o comportamento semellante ao depresivo poderían non estar totalmente relacionados. Non obstante, a hipótese de que un déficit na neuroxénese hipocámpal podería xogar un papel na depresión cada vez adquire máis importancia así como o coñecemento de que elevados niveis crónicos de glicocorticoides inhiben a neuroxénese (Jacobs e cols., 2000; Jacobs, 2002; Dranovsky e Hen, 2006). Ademais, tamén se viu que os tratamentos antidepressivos propician un incremento da neuroxénese, os máis clásicos son os inhibidores da recaptación de serotonina, o cal aporta un punto de apoio á hipótese de que unha deficiencia na neuroxénese forma parte da etiopatoloxía da depresión (Kempermann e Kronenberg, 2003). Non obstante existe unha liña de pensamento en contra desta hipótese baseada en estudos que non atoparon unha relación directa nalgúns modelos animais entre unha deficiencia na neuroxénese e un comportamento semellante ao depresivo, así como en estudos realizados en tecido *postmortem* de pacientes con depresión onde parece que non se detecta unha alteración na neuroxénese (Vollmayr e cols., 2003; Reif e cols., 2006). Non obstante, a pesares destes datos, a maioría dos estudos realizados apoian o papel do déficit na neuroxénese na patoxénese da depresión.

Unha interpretación interesante dos nosos resultados podería ser que as alteracións na neuroxénese teñen un efecto negativo a nivel funcional a partir dun certo grao de dexeneración. Os nosos resultados amosan que hai un efecto gradual da dose de CORT sobre o número de células que expresan DCX, de tal xeito que as doses maiores son as que

presentan un número moito menor de células que se están formando de novo, de forma especial os animais inxectados coa maior dose de CORT, 20 mg/kg. Ademais, é neste grupo onde atopamos un maior número de células que presentan un escaso ou nulo desenvolvemento das dendritas e, paralelamente, un menor número de células que posúen unha arborización dendrítica complexa. Estes datos complementáanse cos obtidos en comportamento posto que é precisamente no grupo que recibiu a dose maior de CORT, onde vemos unha redución significativa no tempo de natación e un incremento significativo no tempo de inmovilidade cando sometemos a estes animais á proba da natación forzada. Este feito parece suxerir que é precisa unha redución substancial da neuroxénese, pero tamén da diferenciación e maduración das células que sobreviven, para que se poida detectar un efecto claro a nivel de comportamento.

En anteriores estudos realizados con ratas viuse que o efecto de CORT ocorre principalmente sobre as células reelina positivas (Lussier e cols., 2009), o cal fai moi interesante ver, se cando se aplica este tratamento de CORT a animais que *per se* xa posúen unha menor expresión da reelina, estes presentan un maior grao de vulnerabilidade cós WTM fronte aos efectos da CORT.

Polo que podemos ver, o efecto do xenotipo en se mesmo non parece alterar o número de células reelina positivas, nin o número de células que expresan DCX, así como tampouco parece causar un efecto importante a nivel de comportamento, posto que tanto WTM como

HRM pertencentes ao grupo control presentan uns patróns de comportamento moi semellantes.

Os resultados do noso estudo amosan que a menor expresión de reelina presente nos HRM parece que lles confire unha maior vulnerabilidade fronte aos efectos da administración de CORT, posto que, só no grupo dos HRM atopamos un claro efecto dose dependente da CORT sobre o número de células reelina positivas e as células DCX positivas. Nos HRM que recibiron as doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg atopamos unha redución significativa do número de células que expresan reelina e DCX presentes no SGZ e no *hilus*. Esta redución non se observou nos WTM inxectados coas mesmas doses de CORT. Este claro efecto xenotípico non é tan aparente cando se estuda a expresión de DCX, onde atopamos unha redución no número de células DCX positivas, en ambos xenotipos, aínda que só no grupo dos HRM estas diferenzas chegan a ser estatisticamente significativas. Ademais, cando se clasifican as células que expresan DCX segundo o seu grao de diferenciación, atopamos que existe un incremento do número de células correspondentes á categoría 1, que son as células que non presentan árbore dendrítica, tanto dentro dos WTM como dos HRM que recibiron a maior dose de CORT. En canto ás restantes categorías, que abranguen as células máis desenvoltas e coas árbores dendríticas máis diferenciadas e complexas, existe unha tendencia á redución dependente da dose dentro dos WTM, pero esta tendencia faise estatisticamente significativa dentro dos HRM, especialmente no grupo de dose máis elevada. O

efecto da CORT parece ser maior nos animais HRM que *per se* presentan unha menor expresión de reelina, e dito efecto negativo sobre o número de células reelina positivas podería ter como consecuencia a posterior redución no número de células que se forman de novo, así como no grao de maduración alcanzado polas que sobreviven. Estudos previos amosaron que a reelina participa no desenvolvemento das novas células que se forman na SGZ e na súa correcta migración e integración na capa molecular (Beffert e cols., 2002; Keilani e cols., 2012). Unha inadecuada migración e integración das células formadas de novo, podería supoñer alteracións nos procesos de formación da memoria e aprendizaxe que se producen no hipocampo, ditas alteracións téñense observado nos ratos HRM e así como en pacientes con depresión e outros trastornos mentais (Fatemi e cols., 2000; Gong e cols., 2007; Lussier e cols., 2009). Estudos recentes apoian a nosa hipótese posto que se viu que unha sobreexpresión da proteína reelina incrementa a proliferación e a supervivencia das células granulares no xiro dentado e, ademais, viuse que esta sobreexpresión de reelina promove o desenvolvemento da arborización dendrítica así como o establecemento dun elevado número de contactos sinápticos (Pujadas e cols., 2010). A nivel funcional viuse que esta sobreexpresión de reelina podía contrarrestar os efectos causados pola administración de CORT, posto que os animais que sobreexpresan reelina amosan un comportamento igual ao que presentan os WTM ao ser sometidos ás probas coma a da natación forzada (Teixeira e cols., 2011).

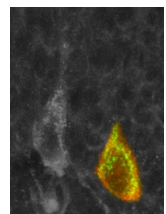
En humanos viuse que existe unha redución nos niveis de reelina en pacientes con trastornos psiquiátricos como a esquizofrenia, autismo, trastorno bipolar ou depresión (Fatemi, 2001). Ademais, hai estudos que demostraron que estes pacientes amosan no PFC, no hipocampo e no córtex cingulado unha redución no número de células que expresan reelina (Guidotti e cols., 2000; Fatemi e cols., 2001). Aínda que estes autores non viron a alteración no xiro dentado que se detalla neste capítulo, en pacientes con trastorno bipolar e depresión maior si se observa unha tendencia á baixa, aínda que non estatisticamente significativa. Máis recentemente, outros autores parecen confirmar esta redución no número de células reelina positivas no *hilus* presente nestes pacientes (Torrey e cols., 2005). Tal vez sería preciso facer un estudo máis exhaustivo sobre a neuroxénese no xiro dentado destes pacientes e identificar as células piramidais en cesto e as células do *hilus* que expresan reelina e estudar se existe algún tipo de déficit. Se se detectase unha redución no número de células reelina positivas asociada á depresión daría máis peso á hipótese de que deficiencias na neuroxénese xogan un papel moi importante na patoloxía da depresión. Por outra banda, os procesos de maduración e integración das células que se forman de novo deben ser estudados con maior detalle posto que alteracións nestes procesos poden xogar un papel importante nas doenzas psiquiátricas.

Como se viu neste capítulo e tamén no anterior, unha menor expresión de reelina parece conferir vulnerabilidade fronte aos efectos

dun incremento crónico de CORT. Parece claro que son precisos máis estudos para analizar a orixe xenética ou epixénetica de dita vulnerabilidade, fanse necesarios máis estudos *postmortem* en mostras de pacientes con trastornos psiquiátricos para ver o papel que xoga a neuroxénese e todos os eventos posteriores nestas patoloxías mentais e clarificar o papel da reelina en todos estes procesos.

Capítulo 3

Coexpresión da reelina e a óxido nítrico
sintetase neuronal nos ratos
heterocigotos *reeler*



3.1.- INTRODUCCIÓN

O NO é un neurotransmisor inorgánico gasoso de acción autócrina ou parácrina. Sintetízase como un elemento que difunde libre polo que non necesita vesículas sinápticas para se almacenar (Gotti e cols., 2005). O NO é sintetizado pola NOS, este encima presenta tres isoformas: endotelial, inducible e neuronal. Nas neuronas a isoforma encargada de sintetizar NO é a nNOS que cataliza a conversión de L-arginina e osíxeno a NO e citrulina. A NOS emprega para isto unha serie de cofactores, como a diaforase fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase*, NADPHd).

O NO xoga un papel moi importante na plasticidade sináptica, atribúeselle a modulación da actividade dos NMDA e dos AMPA, co cal facilita a potenciación LTP e a formación das espiñas dendríticas no cerebro adulto (Zhou e Zhu, 2009). Considérase que o NO actuaría como un sinal retrógrado que participa na estabilización das conexións sinápticas. Ademais, actúa como antimitótico polo que favorece a diferenciación e maduración neuronal (Mataderrona e cols., 2005). Tamén se sabe que o sistema nitrinérxico xoga un papel destacado na resposta do sistema endócrino ao estrés (Orlando e cols., 2008).

Os pacientes con patoloxías psiquiátricas e mentais, como a esquizofrenia ou a depresión, amosan unha redución no número de células positivas para a nNOS no hipocampo (Akbarian e cols., 1993). Estes pacientes comparten cos ratos HRM a menor expresión de reelina, ademais dunha redución do número de neuronas positivas para a NADPH na substancia branca cortical, e outras alteracións como a redución no número de espiñas dendríticas (Pappas e cols., 2001, Law e cols., 2004).

Algúns autores apuntan que unha deficiencia na expresión da reelina no hipocampo, así como alteracións no NO e na nNOS, poderían actuar como factores de vulnerabilidade fronte ás enfermidades psiquiátricas (Kovács e cols., 2009; Fournier e cols., 2010). Asumimos que podería existir unha posible acción sinérxica da reelina e a nNOS, dado que no bulbo olfactivo viuse que as neuronas que expresan nNOS tamén expresan o receptor para reelina, ApoER2, aínda que curiosamente, estudos realizados en ratos *reeler* adultos non mostran colocación no bulbo olfactivo (Hermann e cols., 2008); non obstante, durante o desenvolvemento as células Cajal-Retzius que expresan reelina tamén expresan a nNOS en ratos e en humanos (Santacana e cols., 1998; Judaš e cols., 1999). No hipocampo, o NO exprésase nalgúns células piramidais en cesto, presentes na SGZ do xiro dentado e nalgúns destas células piramidais en cesto tamén se expresa a reelina (Dun e cols., 1994; Pesold e cols., 1998).

Tendo en conta todo o anteriormente mencionado, consideramos que podería existir algunha conexión funcional entre a reelina e a nNOS na regulación da plasticidade a nivel das espiñas dendríticas no hipocampo. Dita relación funcional podería estar alterada baixo certas condicións patolóxicas que poderían afectar ao hipocampo. Así mesmo, o que se propón neste capítulo é estudar a posible colocación da reelina e a nNOS no hipocampo e no xiro dentado, xa que ambas presentan un patrón inmunohistoquímico moi semellante e tanto a reelina como a nNOS exprésanse en interneuronas GABAérxicas (Gotti e cols., 2005).

Para realizar este estudo, fíxose unha análise previa para confirmar a colocación de ambas proteínas empregando a microscopía confocal segundo se explica no grupo experimental 3 no punto correspondente do apartado de procedementos.

3.2- RESULTADOS

Na figura 1 presentamos unha imaxe de microscopía confocal onde amosamos o patrón de expresión da proteína reelina e da nNOS no hipocampo. A inmunoreactividade da reelina está expresada por un tipo de neuronas tanto no hipocampo como no xiro dentado. Como vemos figura 1A a marcaxe de reelina é principalmente citoplasmática, marcando os corpos celulares e as terminais proximais. Ademais

presenta unha característica marcaxe difusa no ELM do hipocampo, o que correspondería á reelina do espazo extracelular e á expresada no neuropilo. A nNOS observouse en interneuronas no hipocampo e no xiro dentado (Figura 1B) tamén podemos detectar unha intensa marcaxe en zonas do neuropilo e no soma de interneuronas GABAérxicas.

Na figura 2 observamos unha imaxe de microscopía confocal e vemos unha superposición da marcaxe correspondente para a reelina e a correspondente para a nNOS. Podemos ver que existe colocalización na meirande parte das áreas do hipocampo e do xiro dentado, aínda que a porcentaxe da mesma varía entre as distintas capas. Nas capas do hipocampo atopamos coexpresión das proteínas en interneuronas presentes no ER e no ELM, detectamos en torno a un 20% de colocalización en ambas capas. As neuronas piramidais non expresan reelina nin nNOS polo que non mostran colocalización. No EO atopamos interneuronas positivas para reelina e para nNOS, pero non hai colocalización entre ambas proteínas. Este patrón de distribución obsérvase tanto na CA1 como na CA3 do hipocampo. No xiro dentado existe un maior nivel de colocalización, que podemos apreciar en todas as capas, agás na CG dado que as células granulares non expresan reelina. Na CM podemos atopar un 50% de colocalización e na SGZ atopamos que case un 25% das células que expresan reelina tamén expresan nNOS.

Na figura 3A a 3D podemos ver detalles da morfoloxía das interneuronas de varias capas do hipocampo e xiro dentado que

expresan reelina e nNOS: na columna da esquerda vemos unha imaxe tomada dunha sección de 35 μm e na columna da dereita podemos ver unha sección virtual de 1 μm de grosor, que nos confirma a dobre marcaxe, reelina e nNOS, presente no citoplasma das interneuronas. Nunha análise detallada das imaxes vemos que no ER e no ELM, tanto na CA1 como na CA3, a coexpresión ocorre principalmente en neuronas multipolares (Figura 3A e 3E), tamén na ELM e na CM do xiro dentado a colocalización se observa nas interneuronas redondas ou fusiformes (Figura 3B e 3F). Na SGZ, unha subpoboación das células piramidais en cesto mostra colocalización (Figura 3C e 3G) e no *hilus* móstrana algunhas células multipolares (Figura 3D e 3H).

Analizamos os resultados dos recontos realizados mediante unha T-Student, presentamos ditos resultados en termos de porcentaxes de colocalización na táboa 1. As porcentaxes de colocalización obtidas nas capas do hipocampo non presentan diferenzas significativas entre os ratos HRM e os WTM, todos os valores de $p > 0,05$. Non obstante, no xiro dentado os HRM presentan alteracións en ditas porcentaxes de colocalización respecto aos WTM: atopamos que existe unha redución do 40 e 45% na CM e SGZ, respectivamente [CM: $t(15)=4,10$, $p=0,01$; SGZ: $t(15)=3,01$, $p=0,01$]. Na gráfica 1 represéntase o descrito na táboa. Na figura 4A e 4B podemos comprobar como efectivamente existe unha menor colocalización da proteína reelina e nNOS no CM dos HRM, do mesmo xeito nas figuras 4C e 4D vemos unha notable redución da coexpresión de ambas proteínas no SGZ dos HRM.

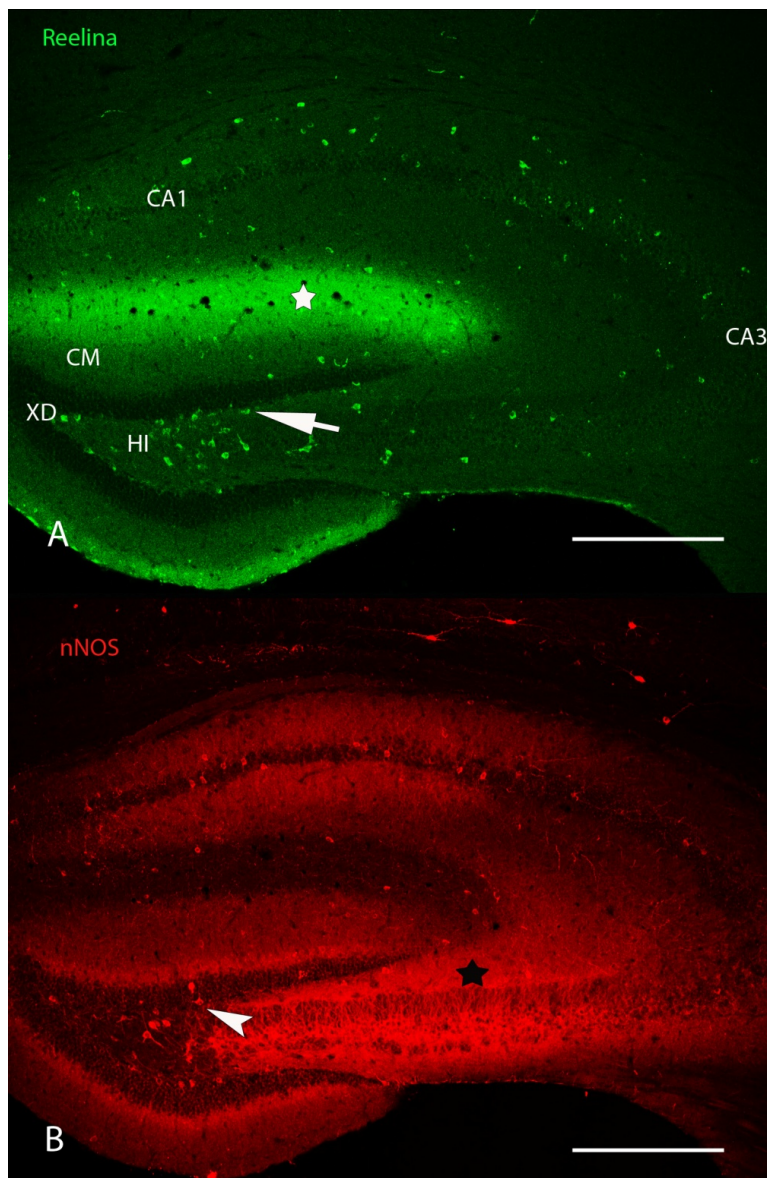


Figura 1: Imaxes dunha sección transversal do hipocampo de rato salvaxe procesadas mediante dobre inmunofluorescencia para reelina (A) e nNOS (B) onde se observan numerosas células positivas para reelina (A) e nNOS (B) por todas as capas do hipocampo e xiro dentado (frecha branca en A, e cabeza de frecha en B). Notese ademais a “praia” de reelina no ELM do hipocampo (A, estrela branca) e a marcaxe para nNOS no neuropilo do hipocampo (B, estrela negra). A barra de calibrado correspondente 300 μm .

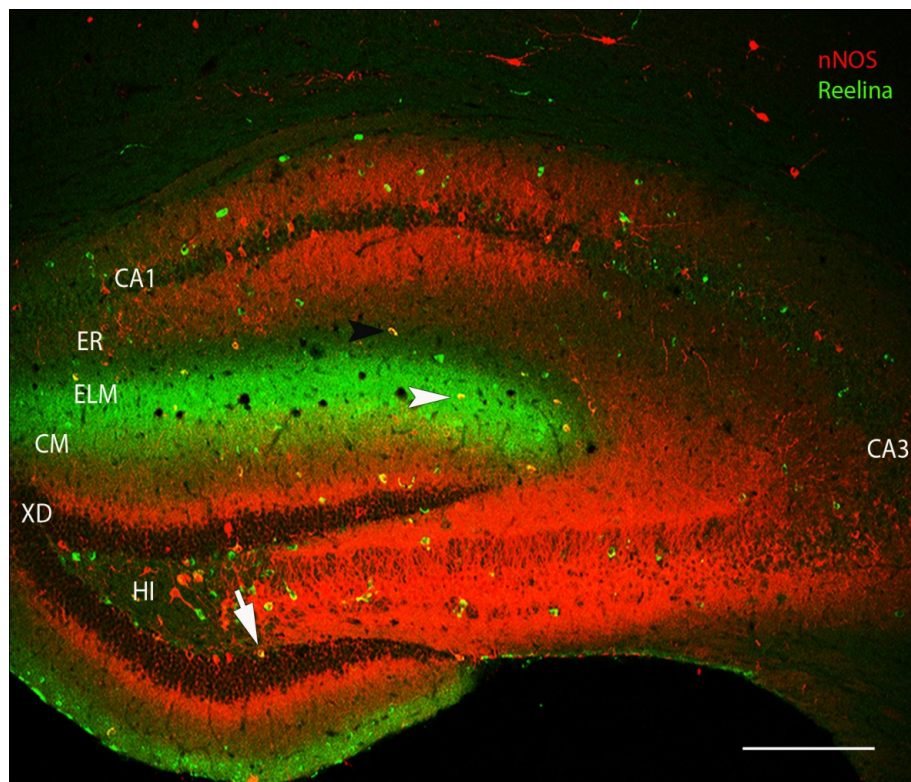


Figura 2: Imaxe de microscopía confocal correspondente á superposición das imaxes da figura 1 onde se observa a colocación (amarelo) da reelina e da nNOS. No hipocampo podemos ver que a reelina e a nNOS colocan en interneuronas GABAéxicas distribuídas polo ER (cabeza de frecha negra), no ELM (cabeza de frecha branca). No xiro dentado vemos colocación na CM, na SGZ (frecha branca) e no *hilus*. A barra de calibrado equivale a 300 μ m. Abreviaturas: ER: estrato radiado; ELM: estrato lacunoso molecular; CM: capa molecular; XD: xiro dentado; HI: *hilus*.

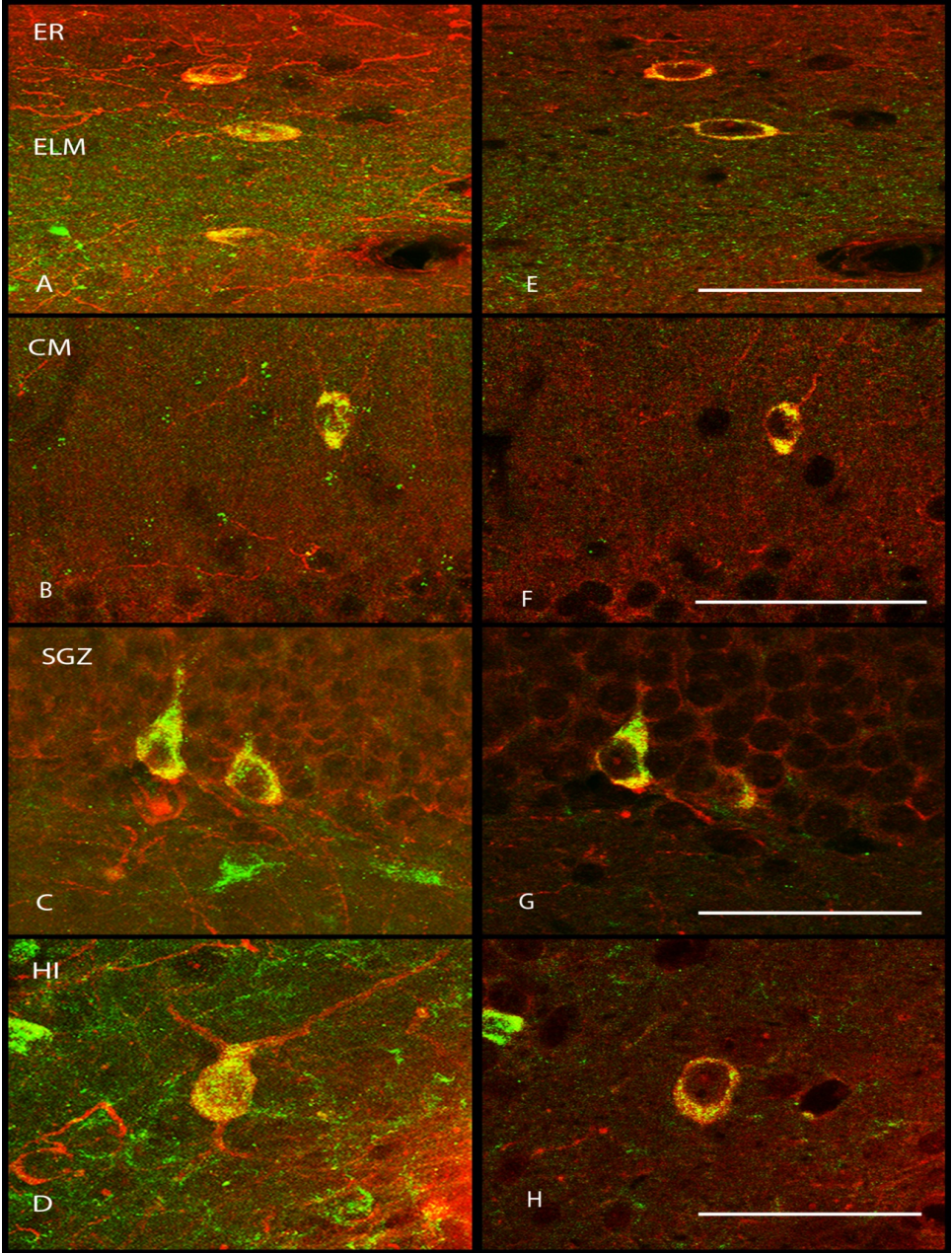
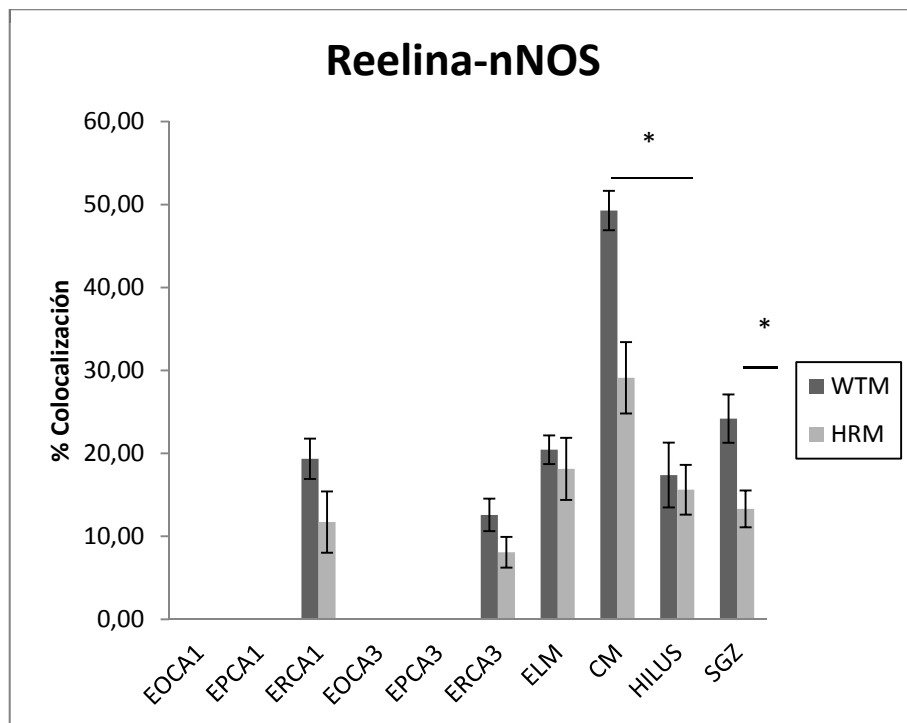


Figura 3: Imaxes a maior aumento onde se observa a colocalización (amarelo) entre reelina e nNOS no hipocampo e xiro dentado. Os detalles A,B,C,D corresponden a seccións de 35 μm de grosor e os detalles E,F,G,H a unha sección virtual de 1 μm tomada do microscopio confocal para confirmar a colocalización entre a reelina e nNOS. Nas imaxes 3A e 3E) vemos colocalización nas interneuronas situadas no ELM e ER. Nas imaxes 3B e 3F) observase colocalización na CM en células principalmente fusiformes. Na 3C e 3G) pódense ver células piramidais en cesto que presentan colocalización da reelina e a nNOS na SGZ. Na 3D e 3H) reelina e nNOS colocalizan en interneuronas presentes no *hilus*. A barra de calibrado equivale a 50 μm . Abreviaturas: ER: estrato radiado; ELM: estrato lacunoso molecular; CM: capa molecular; SGZ: zona subgranular; HI: *hilus*.

Reelina- nNOS	WTM	HRM	% diferenzas
EO CA1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
EP CA1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
ER CA1	19,35 ± 2,43	11,72 ± 3,70	-
EO CA3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
EP CA3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
ER CA3	12,58 ± 1,96	8,08 ± 1,86	-
ELM	20,44 ± 1,72	18,13 ± 3,74	-
CM	49,28 ± 2,38	29,11 ± 4,31	↓ 40%
HILUS	17,39 ± 3,90	15,62 ± 3,00	-
SGZ	24,19 ± 2,92	13,31 ± 2,22	↓ 45%

Táboa 1: Porcentaxe de colocación entre a reelina e a nNOS en cada capa do hipocampo e xiro dentado. Na CM e SGZ do xiro dentado detectamos unha redución significativa na colocación das proteínas reelina e nNOS. Para as diferenzas estatisticamente significativas a T-Student presentou valores de $p < 0,05$.



Gráfica 1: Representación gráfica dos datos de colocalización reelina-nNOS nas distintas capas hipocampais e do xiro dentado.

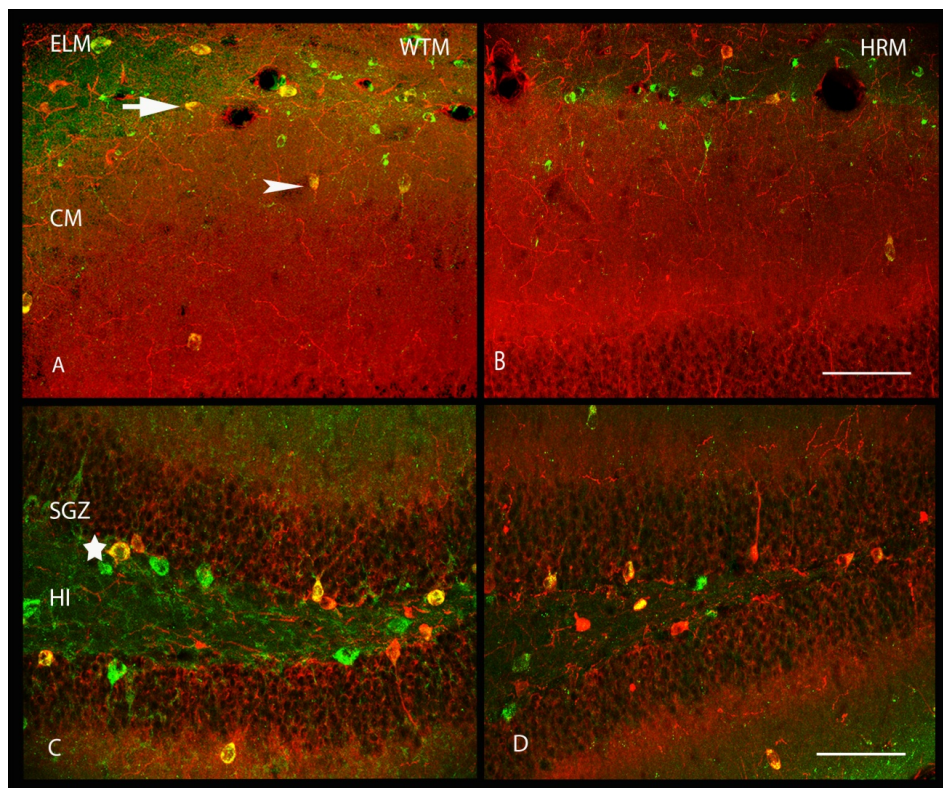


Figura 4: Fotografía con microscopía confocal do xiro dentado presentando a superposición da maraxe da reelina e da nNOS. Nos detalles 4A e 4B) amosamos a colocalización no ELM (frecha branca) e na CM (cabeza de frecha branca) nos WTM e nos HRM, estes presentan unha redución de aproximadamente un 40% da colocalización entre a reelina e a nNOS respecto aos WTM na CM. Nos detalles 4C e 4D) presentamos a colocalización entre a reelina e a nNOS na SGZ (estrela branca) e no hilus, e vemos que hai unha menor coexpresión entre a reelina e a nNOS nos HRM respecto aos WTM. A barra de calibrado corresponde a 75 μ m. Abreviaturas: ELM: estrato lacunoso molecular; CM: capa molecular; SGZ: zona subgranular; HI: *hilus*.

3.3- DISCUSIÓN

Neste estudo vemos por primeira vez que nas capas de hipocampo e do xiro dentado existe unha subpoboación de células que expresan reelina e á súa vez tamén expresan nNOS. Ademais, en certas capas, esta coexpresión aparece significativamente reducida nos HRM, presentando unha menor expresión dos niveis de reelina, en torno a un 50% menos que os WTM (Tueting e cols., 1999). A pesar de presentar esta redución, a proteína reelina detéctase nestes animais mediante inmunohistoquímica aínda que nalgúns casos se pode detectar unha menor intensidade de sinal (Figura 4). Este feito condicionou a forma de analizar a colocación, de tal xeito que se estudaron as células reelina positivas que expresan nNOS, e non ao revés, para evitar posibles falsos negativos ocasionados pola menor intensidade de tinguidura da reelina.

Ata onde nós sabemos, non hai estudos previos sobre a coexpresión das proteínas reelina e nNOS no hipocampo de roedores aínda que podemos atopar algún estudo previo que relaciona funcionalmente ambas proteínas no bulbo olfactivo (Herrmann e cols., 2008). Neste estudo móstrase que neuronas que expresan nNOS tamén expresan receptores para a reelina, pero non expresan dita proteína. Non obstante, estudos previos xa amosaron que as interneuronas GABAérxicas presentes nas capas do hipocampo expresaban nNOS así mesmo, no xiro dentado, un subtipo de células piramidais en cesto que son positivas para somatostatina tamén expresan a nNOS (Dun e cols.,

1994; Jinno e cols., 2001; Jinno e Kosaka, 2002). Considerando que un subtipo destas células piramidais en cesto tamén expresan reelina (Pesold e cols., 1998), especulamos coa posibilidade de que ambas proteínas poderían aparecer expresadas conxuntamente na mesma subpoboación neuronal.

Fronte ao observado no bulbo olfactivo, os nosos resultados mostran que o 25% das células piramidais en cesto que expresan reelina tamén expresan nNOS e, de feito, esta colocalización non se restrinxe unicamente a esta zona senón que atopamos altos niveis de colocalización noutras capas do hipocampo e xiro dentado: en torno a un 20% no *hilus*, no ER e no ELM e sobre un 50% na CM do xiro dentado. Non se detectou colocalización nas interneuronas do EO nin nas células da capa piramidal e granular.

No córtex e hipocampo adultos, a reelina sintetízase principalmente en interneuronas GABAérxicas que establecen conexións sobre as dendritas apicais das células piramidais, o que explica que a reelina se observe na superficie das espiñas dendríticas (Pesold e cols., 1998; Rodríguez e cols., 2000). A reelina actúa sobre os receptores NMDA a través da unión aos seus receptores ApoER2 e VLDL, promovendo así a plasticidade sináptica no hipocampo. Cando a reelina se une aos seus receptores actívase un cadoiro de quinases, como a SFK que fosforila as subunidades dos receptores NMDA, favorecendo a entrada de Ca^{+2} e promovendo a LTP. Ademais, o receptor ApoER2 pode sufrir un corte e empalme alternativo da secuencia intracelular e cando

isto ocorre, a unión da reelina ao seu receptor promove a unión deste á PSD95 que está ancorada aos receptores NMDA, desta forma os NMDA son recrutados á zona da sinapse favorecendo así todos os procesos de potenciación a longo prazo (Weeber e cols., 2002; Chen e cols., 2005; Qiu e cols., 2006). Así mesmo, o incremento de Ca^{+2} estimula a actividade do encima nNOS que promove a plasticidade sináptica e xoga un papel importante durante os procesos de aprendizaxe e memoria (Zhou e Zhu, 2009). O feito de que a reelina e a nNOS aparezan colocalizadas nas interneuronas situadas no ER e no ELM, pero que non o fagan nas interneuronas do EO, podería suxerir unha función sinérxica de ambas proteínas, posto que estas interneuronas establecen contactos coas dendritas apicais, especialmente na porción máis distal, das neuronas piramidais facilitando as conexións glutamatérxicas e favorecendo deste xeito a LTP. Poderíamos entón especular coa idea de que a función conxunta da nNOS e da reelina sería potenciar as conexións establecidas polas neuronas piramidais e polas células granulares, e dita acción conxunta facilitaría a potenciación a longo prazo e, polo tanto, os procesos de aprendizaxe e da memoria.

Por outra banda, a colocalización presente na subpoboación de células piramidais en cesto da SGZ resulta interesante, dado que estas células establecen contactos sobre o soma das neuronas granulares, modulando así as conexións que establecen estas neuronas: os seus axóns, coñecidos como as fibras musgosas, son as únicas conexións dentro da vía trisináptica que saen do xiro dentado, co cal estas células

piramidais en cesto que coexpresan reelina e nNOS poderían estar regulando a transmisión de información a través do circuíto trisináptico.

Así mesmo, a SGZ é un dos nichos neuroxénicos presentes no cerebro adulto polo que a liberación de reelina e de NO por parte destas neuronas piramidais en cesto localizadas nesta zona, xunto coas situadas no *hilus*, podería influír na migración e na maduración das novas células granulares. Existen traballos previos que apuntan nesta dirección: a administración repetida de CORT en altas doses a ratas causa un comportamento semellante a depresivo e unha redución significativa das células reelina positivas na SGZ ademais dunha redución no número de células que se forman de novo (Lussier e cols., 2009). De feito, no noso propio traballo con HRM aos que se lles inxectou CORT vimos que na SGZ existe unha redución no número de células reelina positivas, unha redución no número de células que se forman de novo e un menor no grao de maduración das células que sobreviven, o cal á súa vez correlaciónase cun comportamento semellante a depresivo, e puidera ser que a redución nos HRM do número de células que coexpresan reelina e nNOS estivera contribuíndo á maior vulnerabilidade presentada por estes animais fronte aos altos niveis de CORT. Outros grupos de investigación observaron que unha sobreexpresión de reelina causa un incremento na neuroxénese, o que comporta un maior número de contactos sinápticos e unha hipertrofia das dendritas (Pujadas e cols., 2010). Todos estes datos parecen aportar certa solidez á idea de que as células que expresan reelina na SGZ

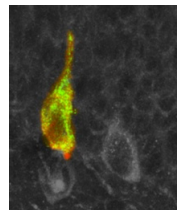
exercen un papel importante na neuroxénese e puidera ser que estas células fosen, en concreto, aquelas que tamén expresan nNOS.

Outros autores amosaron unha diminución na expresión da nNOS pero non do seu ARN mensaxeiro no bulbo olfactivo (Hermann e cols., 2007), non obstante, no noso estudo observamos unha diminución importante das células que expresan reelina e nNOS, un 40% na SGZ e un 45% na CM. Se extrapolamos esta información a un punto de vista funcional poderíamos pensar que esta redución podería estar detrás, ou ser unha das posibles causas, das alteracións a nivel do comportamento visto por outros autores nos HRM, como son as alteracións observadas nas probas do medo condicionado a un contexto e que confirman unha menor capacidade de aprendizaxe asociativa, ou na inhibición do prepulso. Así mesmo, estes animais presentan alteracións na LTP e na LTD e, de feito, un incremento na expresión de reelina recupera estas deficiencias (Qiu e cols., 2006). Paralelamente, os estudos realizados con mutantes que non expresaban nNOS tamén mostraban un déficit no comportamento nas probas de medo condicionado a un contexto (Kelley e cols., 2009 e 2010). Ademais outros estudos realizados a nivel molecular apuntan que o NO facilita a LTP mediante a actuación sobre os receptores NMDA a través da guanilil ciclase (GC) así mesmo a nNOS está vinculada cos receptores NMDA a través da unión ao dominio PSD95 (Taqaatqeh e cols., 2009; Doucet e cols., 2012). Todos estes experimentos están realizados centrándose principalmente na LTP que ten lugar nas células piramidais da CA1, non obstante, tería moito

interese ampliar ditos estudos e ver como afecta unha deficiencia na coexpresión de reelina e nNOS na LTP que ten lugar na xiro dentado dos HRM. No xiro dentado, a LTP estimula a neuroxénese e a supervivencia das células formadas de novo ademais de favorecer a súa maduración, mentres que a LTD inhibe este efecto positivo sobre a neuroxénese (Brüel-Jungeman e cols., 2006; Chun e cols., 2006 e 2009). En calquera caso, o feito de que a reelina e a nNOS xoguen papeis moi semellantes no sistema nervioso central, participando de xeito especial en procesos de plasticidade sináptica que teñen lugar no hipocampo, xunto co resultado presentado neste capítulo onde amosamos a colocalización de ambas proteínas, podería suxerir que a reelina e a nNOS regulan xuntas a funcionalidade do hipocampo; e por outra parte o feito de que dita colocalización apareza reducida no xiro dentado dos HRM podería aportar unha explicación aos déficits en aprendizaxe e comportamento observados nestes animais.

Capítulo 4

Efecto da corticosterona sobre a coexpresión da
reelina e da óxido nítrico sintetase neuronal
na zona subgranular do xiro dentado



4.1.- INTRODUCCIÓN

O encima óxido nítrico sintetase neuronal é o principal encargado de sintetizar NO no cerebro adulto. Como xa comentamos no capítulo anterior, a nNOS aparece expresada no hipocampo por certos subtipos de interneuronas GABAérxicas. Así mesmo, a proteína reelina tamén é amplamente expresada en interneuronas GABAérxicas do hipocampo (Alcántara e cols., 1998; Pesold e cols., 1998). No capítulo 3 vimos que existe unha subpoboación de interneuronas que coexpresan reelina e nNOS e, ademais, dita colocalización está significativamente reducida na SGZ e na CM do xiro dentado dos HRM.

Ante unha situación de estrés actívase o eixe HPA, o cal ten como consecuencia última a liberación de CORT ao torrente sanguíneo chegando ao sistema nervioso central e os altos niveis de CORT supoñen un factor clave na etiopatoloxía de trastornos psiquiátricos como a depresión (Duman, 2002). A CORT modifica a actividade dos sistemas de neurotransmisores estimulando a liberación de glutamato e noradrenalina e limitando a actuación da serotonina e dopamina (Wegener e cols., 2000). Coa liberación de glutamato estímase a actividade dos receptores NMDA incrementando a entrada de Ca^{+2} , o que produce a activación da CAMKII, esta á súa vez activa a nNOS e, polo tanto, a produción de NO na neurona (Riedel, 2000). Ademais, a

nNOS está vinculada mediante o seu dominio PDZ aos receptores NMDA a través da unión á proteína PSD95 (Doucet e cols., 2012).

No hipocampo hai receptores para os glicocorticoides, os cales están saturados cando os niveis de CORT son moi elevados, a unión da CORT aos seus receptores no hipocampo regula a actuación do eixe HPA levando á inhibición do mesmo coa conseguinte recuperación dos niveis de CORT (McLeod e cols., 2006). Cando ten lugar unha situación de estrés crónico, os niveis de CORT causan un incremento na actividade dos receptores NMDA e tamén da nNOS (Riedel, 2000; McLeod e cols., 2006), isto afecta á expresión do BDNF e tamén provocaría outras alteracións no hipocampo (McLeod e cols., 2006; Gourley e cols., 2008). A nNOS aparece expresada en interneuronas que tamén presentan receptores para os glicocorticoides, esta colocación podémola atopar en áreas cerebrais como o PFC, núcleo rafe, a amígdala e, por suposto, o hipocampo (Vanhatalo e Soinila, 1995; López-Figueroa e cols., 1998; McLeod e cols., 2006).

É de interese subliñar que un recente estudo mostrou que as células que expresan reelina expresan receptores para os glicocorticoides (Gross e cols., 2012), así mesmo, nos capítulos 1 e 2 vimos que a administración crónica de CORT en doses elevadas altera a expresión da proteína reelina reducindo o número de células reelina positivas, e que dita redución está especialmente acentuada nos ratos HRM, os cales tamén presentan síntomas depresivos detectados mediante probas de

comportamento, como a natación forzada, onde mostran un maior tempo de inmovilidade e menor tempo de natación que os ratos WTM.

Considerando toda a información previa propuxémonos ver se a dose máis elevada de CORT, 20 mg/kg, afecta dalgunha maneira á subpoboación de células reelina positivas que tamén expresan nNOS. Neste estudo faremos un relato das células que coexpresan a reelina e a nNOS, centrándonos de forma especial na SGZ, dado que esta é a zona que se ve principalmente alterada polos niveis elevados de CORT e onde tamén se viu unha maior alteración da colocalización entre a reelina e a nNOS nos HRM.

Realizamos este estudo tal e como se explicou no grupo experimental 3. A análise de colocalización realízase sobre seccións de tecido sobre as que realizamos unha inmunohistoquímica dobre coa que detectamos a expresión de reelina e de nNOS. Confirmamos a inmunopositividade analizando as seccións mediante microscopía confocal tal e como se explica no apartado de procedementos correspondente.

4.2.- RESULTADOS

Neste estudo analizamos as posibles alteracións na coexpresión da reelina e da nNOS en animais que recibiron a dose de 20 mg/kg de CORT e, de xeito especial, quixemos ver que ocorre con esta colocación na SGZ de animais que en si mesmos presentan unha menor expresión de reelina. Analizamos as neuronas que expresan reelina e que tamén expresan nNOS e non ao contrario, posto que os ratos HRM presentan menor expresión de reelina o que podería facer que algunhas das células presentasen unha tinguída máis tenue para a reelina e que fose enmascarada pola tinguída da nNOS, dando así un falso negativo.

Como podemos ver na figura 1A e 1B, onde se indica o patrón de expresión da reelina e da nNOS respectivamente, ambas aparecen principalmente expresadas en zonas do neuropilo e nas interneuronas GABAérxicas, distribuídas por todas as capas do hipocampo e xiro dentado. Na figura 1C confirmamos o resultado presentado no capítulo 3 onde se describiu a colocación entre a reelina e a nNOS, estas parecen coexpresadas nunha subpoboación de interneuronas GABAérxicas de morfoloxía fusiforme e estrelada que aparece distribuída por todas as capas do hipocampo, agás no EO onde vimos células que expresan reelina e células que expresan nNOS pero non unha poboación de células nas que ambas proteínas colocálen. Así mesmo, na capa piramidal do hipocampo así como na capa granular do

xiro dentado non atopamos colocalización, posto que, tanto as células piramidais como granulares non expresan ningunha destas proteínas.

Os resultados procedentes dos recontos analizáronse mediante unha T-Student, e presentámoslos en termos de porcentaxes de colocalización do mesmo xeito que se fixo no capítulo 3.

Primeiramente presentamos na táboa 1 os datos obtidos para os WTM facendo unha comparación entre o grupo de animais control e o grupo de animais que recibiu 20 mg/kg de CORT. Nesta primeira táboa presentamos os datos correspondentes ás capas do hipocampo e do xiro dentado agás a SGZ, a cal presentaremos nunha táboa distinta.

Nos WTM atopamos que existe un leve incremento na coexpresión entre ambas proteínas no ER, tanto da CA1 como da CA3, así como no ELM correspondente á CA1, non obstante, estas diferenzas non se confirmaron como significativas. Na CM e no *hilus* do xiro dentado vemos unha tendencia á redución da coexpresión da reelina e da nNOS, pero estas diferenzas tampouco son estatisticamente significativas. A análise coa T-Student para estes casos presentaron uns valores de $p > 0,05$.

Na táboa 2 representamos os valores de coexpresión da reelina e da nNOS nos HRM comparando entre os animais que pertencen ao grupo control e os que recibiron 20mg/kg de CORT. Tal e como se presentaba nos WTM, representamos os datos correspondentes ás capas do hipocampo e do xiro dentado agás a SGZ. Ao igual que ocorría nos WTM, existe unha tendencia ao incremento na coexpresión de reelina e

de nNOS nas capas do hipocampo, estas diferenzas non son estatisticamente significativas a pesar de que son elevadas, especialmente no ELM. Nas capas do xiro dentado detectamos unha redución nos niveis de coexpresión, pero dita redución tampouco resultou ser estatisticamente significativa.

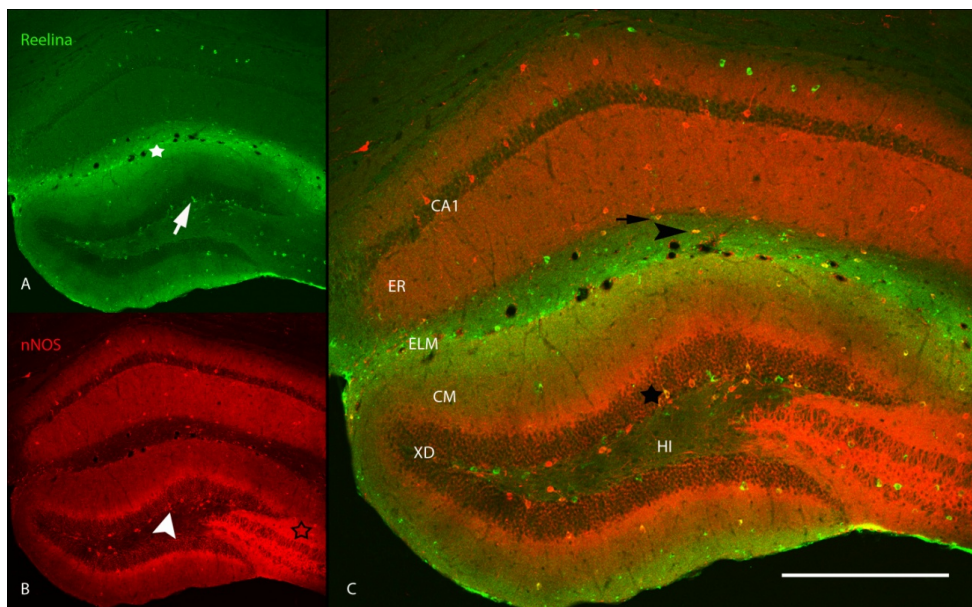


Figura 1: Representación da inmunohistoquímica para a reelina e para a nNOS. a reelina aparece amplamente expresada polas capas do hipocampo e do xiro dentado A) aparece distribuída no citoplasma do soma das interneuronas GABAérxicas (frecha branca), e na matriz extracelular no ELM (estrela branca). A nNOS tamén aparece por zonas do neuropilo (estrela co contorno negro) e no citoplasma das interneuronas GABAérxicas (cabeza de frecha branca). C) Ambas proteínas colocalizan nunha subpoboación de interneuronas GABAérxicas distribuídas por todas as capas do hipocampo (frecha negra e cabeza de frecha negra) e xiro dentado de xeito especial no SGZ (estrela negra). A barra de calibrado equivale a 300 μ m. Abreviaturas: ER: estrato radiado; ELM: estrato lacunoso molecular; CM: capa molecular; XD: xiro dentado; HI: hilus.

WTM	CONTROL	CORT
EOCA1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
EPCA1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ERCA1	34,94 ± 6,80	35,03 ± 6,05
EOCA3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
EPCA3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ERCA3	19,47 ± 3,82	22,35 ± 4,42
ELM	25,95 ± 2,32	27,16 ± 4,40
CM	51,08 ± 8,04	44,15 ± 4,39
HILUS	27,50 ± 5,57	17,76 ± 3,86

Táboa 1: Representamos a porcentaxe de colocalización entre a reelina e a nNOS nas diferentes áreas do hipocampo e do xiro dentado agás o SGZ dos WTM, facendo unha comparativa entre o grupo control e grupo que recibiu CORT. Nas capas do hipocampo atopamos unha certa tendencia ao incremento da coexpresión nos animais que recibiron CORT respecto aos WTM do grupo control, mentres na CM e no *hilus* do xiro dentado atopamos unha leve tendencia á redución da coexpresión da reelina e da nNOS.

HRM	CONTROL	CORT
EOCA1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
EPCA1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ERCA1	24,14 ± 5,33	32,45 ± 6,67
EOCA3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
EPCA3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ERCA3	11,91 ± 3,58	18,04 ± 7,37
ELM	25,47 ± 3,29	40,09 ± 8,75
CM	42,71 ± 5,74	34,53 ± 4,65
HILUS	28,51 ± 6,99	21,85 ± 4,69

Táboa 2: Presentamos as porcentaxes de colocación entre a reelina e a nNOS nos HRM, comparando entre os animais do grupo control e os que recibiron CORT. Nas capas do hipocampo hai un leve incremento nos animais que recibiron CORT, e nas capas do xiro dentado presentamos unha redución na coexpresión da reelina e da nNOS nos animais que recibiron CORT. A T-Student non mostrou diferenzas significativas entre estes grupos, os valores de $p > 0,05$.

A SGZ é a zona máis vulnerable fronte á inxección de CORT en altas doses, de xeito especial nos HRM onde detectamos unha redución no número de células reelina positivas así como nas células formadas de novo; así mesmo, nesta zona os HRM presentan unha redución importante nos niveis de colocación entre a reelina e a nNOS. Por esta razón, os datos correspondentes aos recontos realizados na SGZ recibiron o mesmo tratamento estatístico có realizado no capítulo 2 coa fin de obter maior información sobre o que ocorre nesta zona.

Primeiramente, cos datos de colocación correspondentes á SGZ fixemos unha ANOVA de dúas vías para ver se existe un efecto principal do xenotipo ou da CORT sobre a porcentaxe de células que expresan reelina e nNOS. Con esta ANOVA de dúas vías vimos que non hai un efecto principal nin do xenotipo nin da dose de CORT inxectada [xenotipo: $F(1, 22)=19,03$, $p>0,48$; dose: $F(1, 22)=0,06$, $p=0,97$], non obstante, ambas variables presentan unha interacción significativa entre si [$F(1, 22)=406,25$, $p<0,00$]. Presentamos as porcentaxes de coexpresión entre a reelina e a nNOS presentes na SGZ na táboa 3.

Por unha banda, cos datos correspondentes aos animais pertencentes ao grupo control tanto WTM como HRM, confirmamos os valores de colocación observados no capítulo 3 para esta SGZ. Así mesmo, confirmamos unha redución dos niveis de coexpresión entre a reelina e a nNOS dun 43% nos HRM [$t(11)=2,44$, $p=0,04$]. Isto demostra que a inxección en si mesma non ten efecto sobre a colocación. Na figuras 2A e 2B presentamos un exemplo do mencionado: os animais

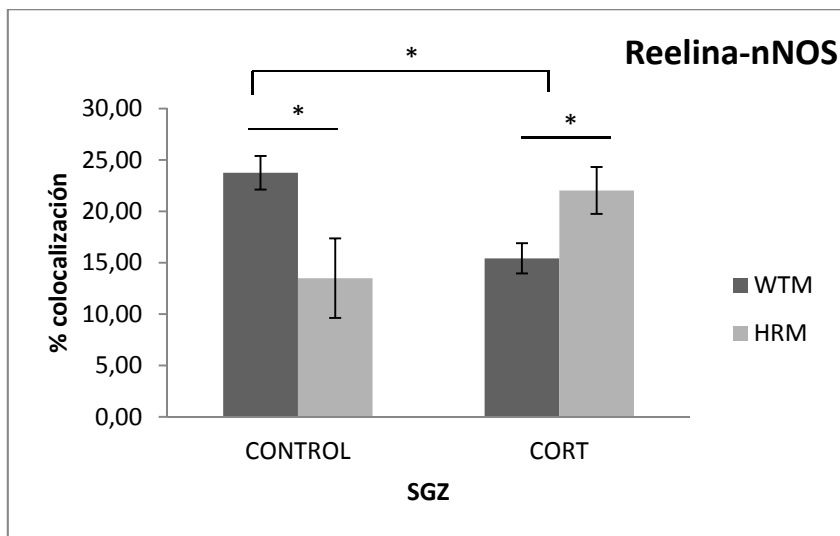
HRM presentan menor porcentaxe de colocalización cós animais de xenotipo salvaxe cando non reciben CORT.

Por outra banda, vemos que cando lles inxectamos CORT, os HRM presentan un incremento dun 43% respecto aos WTM nos niveis de colocalización da reelina e da nNOS estatisticamente significativo [$t(10) = (-2,53)$, $p = 0,03$]. Presentamos as porcentaxes de colocalización obtidas para o grupo de animais que recibiron CORT na gráfica 4. Nas figuras 2C e 2D vemos unha mostra representativa do incremento nos niveis de coexpresión de reelina e de nNOS presentado polos HRM cando reciben unha dose de 20 mg/kg de CORT respecto aos WTM.

Visto dende outro punto de vista podemos comprobar que nos WTM que reciben CORT existe unha redución na coexpresión de reelina e de nNOS no SGZ dun 35%, esta diferenza resultou estatisticamente significativa [$t(11) = 3,78$, $p = 0,00$]. Estes valores tamén están representados na táboa 3. Se comparamos na figura 2A e na figura 2C podemos comprobar como efectivamente existe unha redución nos niveis de colocalización da reelina e da nNOS. Do mesmo xeito, na mesma táboa 3 podemos comparar os datos obtidos nos HRM e atopamos que existe un incremento nos animais que recibiron CORT respecto aos animais do grupo control na porcentaxe de colocalización, nas figuras 2B e 2D presentamos un exemplo de dito incremento nos HRM que recibiron CORT respecto aos que, non obstante, dito incremento non chega a ser estatisticamente significativo, moi probablemente debido ao elevado valor do erro estándar [$t(10) = (-1,80)$, $p > 0,05$].

SGZ	WTM	HRM	% diferenzas
CONTROL	23,75 ± 1,64	13,49 ± 3,87	*↓ 43,18%
CORT	15,42 ± 1,47	22,03 ± 2,28	*↑ 42,86 %
% diferenzas	*↓ 35,07 %	↑ 63,39%	

Táboa 3: Representamos, por unha banda, as diferenzas a nivel de coexpresión de reelina e nNOS, no grupo de animais control comparando entre WTM e HRM onde podemos ver unha redución significativa dos niveis de colocalización. E por outra banda, os valores para os animais que recibiron CORT e facendo a comparación entre WTM e HRM, vemos que existe un incremento significativo da coexpresión nos HRM. Así mesmo, dentro dos WTM, cando reciben CORT mostran unha redución estatisticamente significativa nos niveis de coexpresión de nNOS e reelina, mentres que no caso dos HRM, cando reciben CORT a porcentaxe de colocalización incrementase aínda que non significativamente, a pesar do elevado valor da porcentaxe de incremento.



Gráfica 4: Representación gráfica das porcentaxes de colocalización da reelina e da nNOS. Observamos diferenzas significativas na porcentaxe de colocalización entre WTM e HRM do grupo control. Así mesmo, observamos un incremento significativo na colocalización de nNOS e reelina nos HRM cando reciben CORT. Os WTM presentan unha redución significativa da porcentaxe de coexpresión de reelina e nNOS cando reciben CORT. Para estes casos a T-Student presentou uns valores de $p < 0,05$.

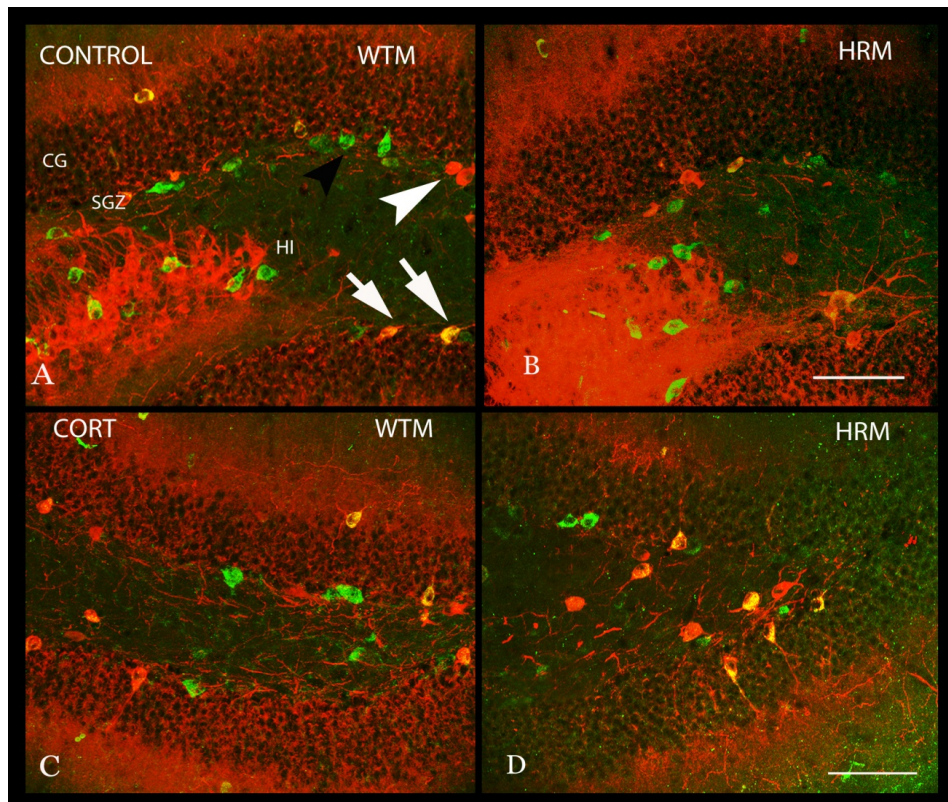


Figura 2: Imaxe de microscopía confocal da colocalización entre a reelina e a nNOS na SGZ do xiro dentado. No detalle A) amosamos a colocalización de ambas proteínas no SGZ dos WTM do grupo control. Podemos ver as células que expresan reelina tinguidas de verde e as que expresan nNOS en vermello (cabeza de frecha negra e branca respectivamente) así mesmo as células nas que ambas proteínas aparecen expresadas presentan cor amarelo (frechas brancas). Nos HRM B) do grupo control apreciamos unha redución no número de células que presentan coexpressión de reelina e de nNOS respecto aos WTM do mesmo grupo. Nos WTM que recibiron CORT C) vemos que existe unha redución clara nos niveis de colocalización entre a reelina e a nNOS respecto aos WTM do grupo control. Na imaxe D) vemos que os HRM que reciben CORT presentan maior nivel de colocalización entre a reelina e nNOS que os HRM que pertencen ao grupo control e que os WTM que tamén recibiron CORT. A barra de calibrado equivale a 75 μm . Abreviaturas: CG: capa granular; SGZ: zona subgranular; HI: *hilus*.

4.3- DISCUSIÓN

Os resultados previos mostrados indican que a reelina e a nNOS aparecen coexpresadas nunha subpoboación de interneuronas GABAérxicas que aparecen distribuídas por todas as capas do hipocampo e do xiro dentado, agás no EO, e tamén vimos que os HRM presentan unha menor porcentaxe de colocalización, principalmente na SGZ, respecto aos WTM. Así mesmo, tamén observamos que a CORT afecta ao número de células reelina positivas localizadas na SGZ do xiro dentado, especialmente nos HRM. Co presente estudo quixemos saber como afecta unha dose de 20 mg/kg de CORT durante 21 días á subpoboación de células reelina positivas presente na SGZ que tamén expresa nNOS.

Cos resultados obtidos confirmamos, por unha banda, a coexpresión da reelina e da nNOS nas interneuronas GABAérxicas do hipocampo; e por outra banda, confirmamos que a colocalización de ambas proteínas está reducida nos HRM respecto aos WTM.

Nos animais WTM, a administración dunha dose de 20 mg/kg de CORT durante 21 días causa unha redución da coexpresión da reelina e da nNOS nas células piramidais en cesto da SGZ respecto aos animais do grupo control. Paralelamente, os WTM que recibiron 20 mg/kg de CORT non presentan alteracións no número de células reelina positivas na SGZ nin tampouco alteracións no comportamento. Recentemente viuse que o sometemento de ratos a un estrés temperán motiva un

incremento do número de células que expresan reelina así como un incremento da expresión de reelina; dito incremento ocorre de forma máis significativa nos machos e mantense dende a infancia ata comezos da idade adulta (Gross e cols., 2012). Ademais, neste estudo viron que a reelina e os receptores de glicocorticoides colocalizan e que un incremento nos niveis de CORT non só promove un incremento na expresión de reelina, senón tamén dos receptores de glicocorticoides (Gross e cols., 2012). Este estudo podería aportar unha explicación aos nosos resultados de tal xeito que a expresión de reelina presente nos WTM mitigaría os danos causados pola administración de CORT, e polo tanto podería estar estimulando a síntese de reelina e tamén dos receptores de glicocorticoides, o que suporía un elemento neuroprotector fronte aos efectos da CORT; estes receptores actúan inhibindo a expresión de nNOS, e unha redución da expresión deste encima podería explicar porqué estes animais presentan un comportamento e un nivel de neuroxénese practicamente igual cós animais do mesmo xenotipo pertencentes ao grupo control. Os resultados obtidos por estudos previos aportan maior solidez a esta hipótese: diversos autores estudaron o efecto da nNOS sobre o comportamento e a neuroxénese traballando en ratos mutantes *knock out* para a nNOS, ou ben que expresan o encima pero bloquéase o seu funcionamento administrando inhibidores como o 7-nitroindazol ou o azul de metileno, estes animais exhiben un menor tempo de inmovilidade na proba da natación forzada cós animais que seguían

expresando nNOS normalmente e, así mesmo, presentaban un nivel de neuroxénese normal (Harkin e cols., 1999 e 2003; Packer e cols., 2003; Lourenço Joca e Guimarães., 2006; Zhou e cols., 2007 e 2011).

Non obstante, parece que a clave na resposta do sistema nervioso fronte ao estrés estaría nos niveis do mesmo así como no tipo de estrés recibido, polo que niveis baixos de estrés promoverían a entrada de Ca^{+2} activando unha serie de cadoiros de transdución de sinal que implican a activación de proteínas quinases como a PKA ou a proteína quinase G (*Protein kinase G*, PKG), as cales fosforilan a nNOS activando ou inhibindo a súa función dependendo do nivel de estimulación recibido de tal xeito que: a niveis baixos de estrés, a nNOS podería actuar promovendo a neuroxénese e a LTP (Kim e Yoon, 1998; López-Figueroa e cols., 1998; Krugers e cols., 2005; Joëls, 2008; Steinert e cols., 2010).

Por outra banda, cando inxectamos 20 mg/kg de CORT aos ratos HRM aparece un incremento da coexpresión da nNOS e da reelina respecto aos animais pertencentes ao grupo control. Este incremento da colocalización entre a nNOS e a reelina concorda con outros estudos recentes realizados en ratos, os cales foron sometidos a procesos de estrés crónico medio ou á inxección de elevadas doses de CORT de forma crónica. Estes estudos tamén mostran que un incremento dos niveis de glicocorticoides comporta un incremento na expresión da nNOS (Zhou e cols., 2007; Zhou e Zhu, 2009; Zhou e cols., 2011; Yazir e cols., 2012). Nestes estudos demostrouse que o incremento da expresión da nNOS implica unha redución na neuroxénese así como alteracións

nas probas de comportamento tal como un incremento no tempo de inmovilidade na proba da natación forzada.

Nos capítulos 1 e 2 deste manuscrito, vimos que o grupo dos HRM que recibiron 20 mg/kg de CORT presenta unha redución significativa no número de células que se forman de novo, así como unha redución no grado de complexidade da arborización dendrítica que posúen estas células; así mesmo este grupo tamén presenta peores resultados nas probas de comportamento, cun maior tempo de inmovilidade e menor tempo de natación na proba da natación forzada. Ademais, tamén presentan unha redución significativa no número de células que expresan reelina, polo que poderíamos supoñer que o incremento da porcentaxe de colocación entre a reelina e a nNOS sería unha consecuencia de dita redución no número de células que expresan reelina. Poderíamos pensar que a poboación de células que só expresan reelina, que ademais nos HRM expresan o 50% menos de reelina, serían máis vulnerables fronte ao efecto dos elevados niveis de CORT sendo precisamente estas as que desaparecen. Non obstante, isto non é excluínte coa posibilidade de que tamén estea tendo lugar un incremento da expresión de nNOS nos HRM que recibiron CORT e esta maior expresión de nNOS podería estar detrás das anomalías a nivel de comportamento e de neuroxénese observadas nestes animais e que, ademais, concordan cos resultados obtidos nos estudos cos ratos *knock out* para a nNOS (Packer e cols., 2003; Zhou e cols., 2007 e 2011).

O feito de que os WTM non mostren as alteracións severas a nivel de neuroxénese e de comportamento coa administración de CORT que si se detectaron nos HRM, permítenos supoñer que a reelina podería ter un efecto neuroprotector fronte aos glicocorticoides. Traballos recentes apuntan á idea do papel neuroprotector da reelina, xa que en ratos mutantes que sobreexpresan dita proteína aos que ademais se lles administra CORT presentan tempos de inmovilidade e de natación normais cando se someten á proba da natación forzada, e tamén presentan un maior número de espiñas dendríticas (Pujadas e cols., 2010; Teixeira e cols., 2011; Fatemi, 2011).

Unha vía pola que a reelina podería exercer este papel neuroprotector sería a través da regulación do intercambio das subunidades dos receptores NMDA porque se sabe que a reelina participa no intercambio da subunidade NR2B pola NR2A que é a máis activa durante a vida adulta, mentres que un estrés elevado favorece a activación dos receptores NMDA que posúen a subunidade NR2B (Qiu e cols., 2006; Xiao e cols., 2010; Gourley e cols., 2009; Tse e cols. 2011). Ambas subunidades dos receptores NMDA estarían activando vías distintas que terían como consecuencia a supervivencia ou a morte neuronal (Xiao e cols., 2010). Cando os receptores NMDA expresan principalmente a subunidade NR2B estanse activando cadoiros de sinalización intracelular que levan á excitotoxicidade (Xiao e cols., 2010). Tal vez poderíamos especular coa posibilidade de que a colocalización da reelina e da nNOS protexería a célula que as coexpresa posto que se

sabe que a nNOS pode regular a actividade dos receptores NMDA (Riedel, 2000).

Todos estes datos concordan co feito de que os tratamentos con antidepressivos como son os inhibidores da recaptación da serotonina, os antidepressivos tricíclicos, os inhibidores da monoamino oxidasa (MAO) ou as substancias inhibidoras dos NMDA teñen un efecto negativo sobre a nNOS (Yildiz e cols., 2000; Harkin e cols., 2003; Wegener e Volke, 2010).

Comparando os nosos estudos cos realizados por outros autores en humanos con depresión e trastornos afectivos, vemos que estes pacientes presentan unha redución dun 50% na expresión de reelina do mesmo xeito que ocorre nos HRM (Guidotti e cols., 2000; Fatemi e cols., 2000; Fatemi 2011). Así mesmo, nos pacientes con depresión e esquizofrenia detectáronse elevados niveis de nitrato en plasma (Suzuki e cols., 2001; Minutolo e cols., 2012) así como un incremento no número de células que expresan nNOS no hipocampo tal e como observamos nos HRM (López-Figueroa, e cols., 1998; Oliveira e cols., 2008). Non obstante os antidepressivos actúan reducindo a expresión da nNOS, o cal fai complexa a análise da expresión da nNOS nos pacientes (Wegener e Volke, 2010).

Os resultados obtidos neste capítulo en conxunto cos obtidos nos capítulos anteriores parecen dar máis apoio á hipótese de que a menor expresión de reelina supón un factor de vulnerabilidade fronte aos efectos do estrés crónico, así mesmo, os animais que presentan unha

alteración da expresión desta proteína, cando reciben doses elevadas de CORT de forma crónica reproducen características dos trastornos mentais como o déficit na neuroxénese, no comportamento, así como un incremento na expresión da nNOS.

Capítulo 5

Marcadores de plasticidade sináptica:
posibles alteracións nos ratos
heterocigotos *reeler*



5.1.- INTRODUCCIÓN

O hipocampo é unha área cerebral que se caracteriza por mostrar un elevado grao de plasticidade neuronal e plasticidade sináptica, asociada a procesos de memoria e aprendizaxe. Este proceso implica remodelación de sinapses preexistentes, por exemplo, a alteración do tamaño da área activa, morfoloxía e forza das sinapses (Lynch, 2004). Neste proceso tamén é fundamental a integración das novas células granulares do xiro dentado e a integración destas células nos circuitos sinápticos.

A proteína reelina xoga un papel importante na estabilización dos contactos sinápticos, especialmente dos que teñen lugar sobre as espiñas dendríticas (Pesold e cols., 1998 e 1999; Borrell e cols., 1999), contribuindo de forma importante á regulación de procesos de plasticidade sináptica (Rodríguez e cols., 2000; Dong e cols., 2003). De feito, en ratos HRM amósase unha diminución do número de espiñas dendríticas no PFC (Liu e cols., 2001), o cal recorda á diminución do número de espiñas dendríticas no PFC de pacientes con esquizofrenia (Costa e cols., 2001). Ademais, en pacientes con esta enfermidade psiquiátrica detectáronse niveis de expresión de reelina de entre un 40 e un 60%, ao igual que ocorre nos ratos HRM (Impagnatiello e cols., 1998; Guidotti e cols., 2000; Fatemi e cols., 2000; Tueting e cols., 2006).

Neste capítulo analizamos a proteína SYN a cal foi empregada en estudos previos para analizar posibles alteracións a nivel de plasticidade sináptica en áreas como o córtex cerebral, o tálamo e o hipocampo en trastornos psiquiátricos (Eastwood e Harrison, 1995 e 2006; Davidsson e cols., 1999; Vawter e cols., 1999; Webster e cols., 2001; Harrison, 2004; Law e cols., 2004). Esta proteína representa un dos marcadores máis empregados no estudo dos procesos de plasticidade, trátase dunha glicoproteína de unión a Ca^{+2} de 38KDa que aparece expresada na membrana de vesículas sinápticas en todas as terminais presinápticas (Tao-Chen, 2006). O feito de que apareza amplamente expresada por todas as áreas cerebrais e en todos os sistemas de neurotransmisión fai que sexa un marcador idóneo para analizar posibles cambios da plasticidade sináptica a nivel xeral.

Ademais do estudo xeral de conexións sinápticas coa marcaxe de SYN, tamén analizamos as conexións establecidas polo principal sistema de neurotransmisión excitatorio, o sistema glutamatérxico, que está directamente implicado na regulación de procesos de potenciación a longo prazo, aprendizaxe e memoria e que así mesmo sábese que está alterado en esquizofrenia (Harrison e cols., 2003; Nanitsos e cols., 2005). Para estudar o sistema glutamatérxico considérase que a forma máis específica é ver o que ocorre cos transportadores vesiculares de GLU posto que só aparecen expresados nas terminais neuronais. Estes transportadores presentan 3 isoformas as cales amosan diferenzas na súa expresión nas distintas áreas cerebrais polo que usamos marcadores para

cada un dos tres. Estes aparecen expresados nas terminais presinápticas e participan no transporte do neurotransmisor ao interior das vesículas sinápticas. Os tres transportadores teñen un peso molecular moi semellante entre os 61 e 64 KDa, e teñen unha estrutura cun alto grao de homoloxía. Parece que a súa principal diferenza reside na distribución ao longo do sistema nervioso central: o VGLUT1 aparece amplamente expresado no neocórtex, hipocampo e amígdala, polo que se considera un marcador de terminais corticais; o VGLUT2 aparece expresado no bulbo olfactivo, tálamo e hipotálamo e pódese observar máis debilmente distribuído no córtex e no hipocampo (Halasy e cols., 2004; Liguz-Lecznar e Skangiel-Kramska, 2007); o VGLUT3 aparece expresado en terminais presinápticas e en menor medida vese en terminais postsinápticas, a diferenza das outras dúas isoformas este transportador tamén se pode observar en interneuronas, así como en neuronas monoaminérxicas e colinérxicas, participando na liberación de glutamato dende as mesmas. O VGLUT3 aparece expresado no hipocampo, en interneuronas GABAérxicas distribuídas polo ER da CA1 ata a CA3 e en terminais presinápticas situadas en torno aos somas das células piramidais. Tamén aparece expresado na amígdala, bulbo olfactivo, así como no tálamo e hipotálamo, e outras áreas como a substancia *nigra* ou a habénula (Herzog e cols., 2004). Parece que non colocaliza co VGLUT1 e 2 (Freneau e cols., 2002; Liguz-Lecznar e Skangiel-Kramska, 2007).

Neste traballo propuxémonos analizar en detalle as posibles alteracións na expresión de distintas proteínas sinápticas no hipocampo

dos HRM respecto aos ratos WTM, para aumentar o noso coñecemento sobre os defectos nos mecanismos de plasticidade sináptica asociados a unha diminución dos niveis de reelina.

Para realizar este estudo empregáronse técnicas inmunohistoquímicas que posteriormente foron analizadas mediante densidade óptica, como se explica no material e métodos, no apartado correspondente ao grupo experimental 4.

Analizamos a expresión dos diversos marcadores de plasticidade mediante un método semicuantitativo como é a análise por densidade óptica empregando o software libre ImageJ. Os datos resultantes da análise analízase cunha T-Student e os resultados preséntanse como as medias e os erros estándar das mesmas.

5.2- RESULTADOS

SINAPTOFISINA

A expresión de SYN é moi ampla podendo observarse en todas as capas do hipocampo como podemos ver na figura 1A e 1B. Tamén podemos comprobar que non hai diferenzas entre WTM e HRM no patrón de distribución da SYN: atopamos unha intensa inmunomarcaxe no EO así como no estrato radiado; a marcaxe faise máis tenue no ELM namentres así mesmo na CA3 tamén podemos atopar un intenso punteado correspondente ao EL. No xiro dentado tamén vemos unha intensa marcaxe na CM e no *hilus*. Podemos ver unha representación gráfica do descrito para a CA1 nos detalles da figura 2A e 2B onde comparamos a distribución da SYN entre WTM e HRM e onde podemos apreciar con maior detalle a marcaxe que rodea os somas das células piramidais e o intenso punteado presente no ER. Así mesmo, nas figuras 2C e 2D vemos a inmunoreactividade presente na CA3, a SYN aparece rodeando os somas das células piramidais e dita distribución non difire entre os WTM e os HRM. Nas capas do xiro dentado tamén atopamos intensa marcaxe nas zonas do neuropilo, como podemos ver nas figuras 2E e 2F, hai unha elevada inmunopositividade na CM así como en toda a zona do *hilus* e na zona inmediatamente inferior á capa granular que corresponde á SGZ. Así mesmo na capa granular podemos ver terminais positivas para a SYN rodeando as células granulares.

Así mesmo, estudáronse as posibles alteracións na expresión da SYN que puideran presentar os HRM, onde hai unha redución na expresión de reelina respecto aos ratos WTM.

Na táboa 1 presentamos os valores de densidade óptica, e vemos que as medidas obtidas nos HRM son moi semellantes ás presentes nos WTM, isto é, nas capas do hipocampo (o ER da CA1 e o ELM) atopamos un leve incremento na tinguidura da SYN nos HRM de entre un 15% e un 18%, non obstante, dito incremento non é significativo. No xiro dentado comezamos a análise subdividindo a capa molecular en: CMD, CMM e CMP, nestas áreas atopamos un incremento leve nos HRM de entorno a un 11%, dito incremento non é estatisticamente significativo. Na SGZ así como no *hilus* atopamos que os HRM tamén presentan un incremento nos valores de densidade óptica para a SYN, de feito estas áreas presentan os maiores valores de densidade óptica para a SYN, os HRM presentan ata un 25% de incremento localizado na SGZ respecto aos WTM, non obstante, este incremento nos valores de densidade óptica tampouco é significativo.

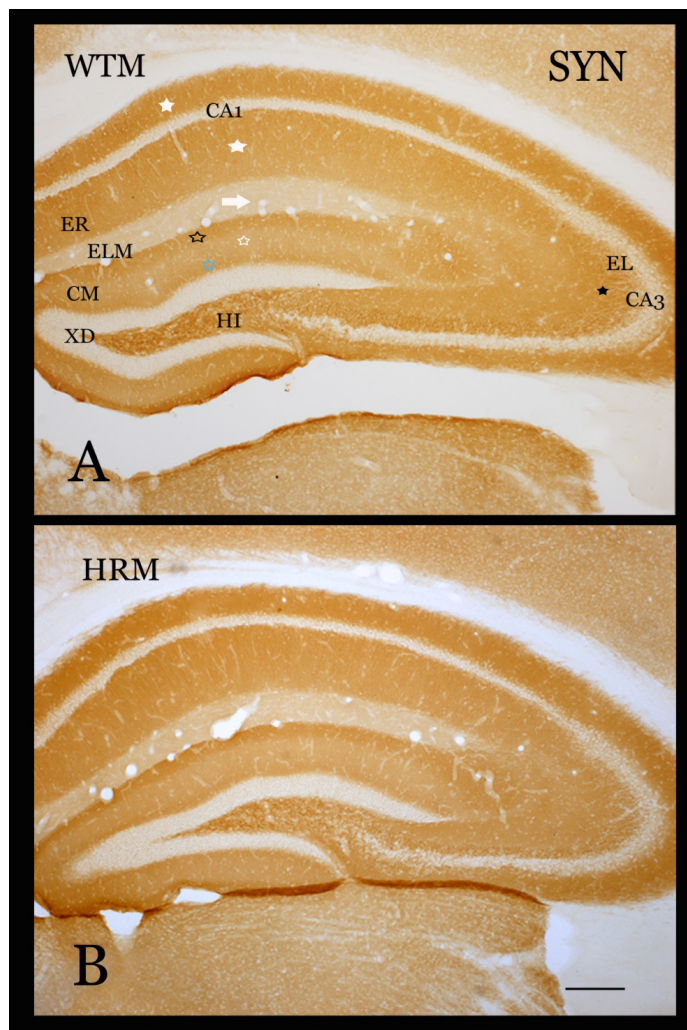


Figura 1: Imaxe panorámica da inmunohistoquímica da SYN. Comparando o patrón de expresión da SYN entre os WTM (A) e os HRM (B). A SYN aparece intensamente expresada no ER, no EO (estrelas brancas), e tamén no EL da CA3 (estrela negra), e a tinguadura fíase máis tenue no ELM (frecha branca). No XD a SYN presenta maior intensidade na CMD e na CMP (contorno de estrelas branca e azul) e na CMM aparece con menor intensidade (contorno de estrela negra). A barra de calibrado equivale a 200 µm. Abreviaturas: ER: estrato radiado; ELM: estrato lacunoso molecular; XD: xiro dentado; CM: capa molecular; CMD: capa molecular distal; CMM: capa molecular medial; CMP: capa molecular proximal; HI: *hilus*.

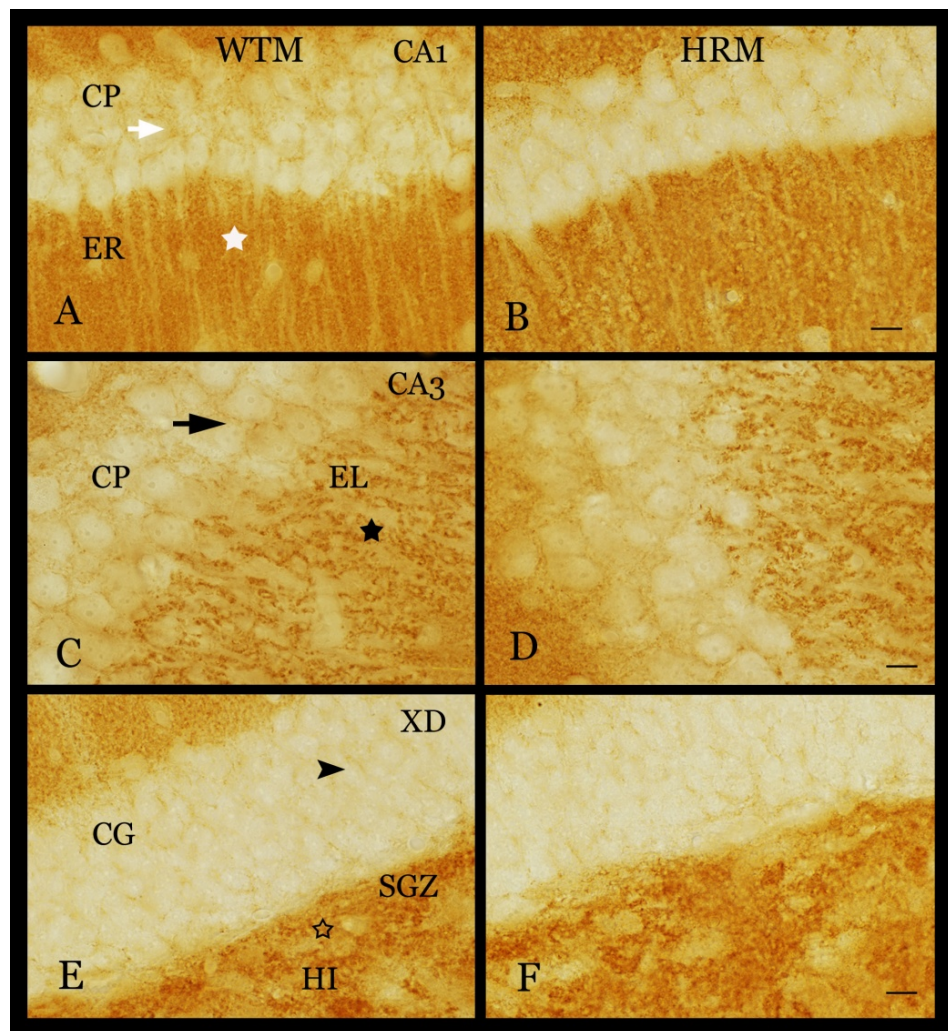


Figura 2: Detalle a maiores aumentos da expresión da SYN. Nas capas do hipocampo podemos ver intensa marcaxe no ER (estrela branca) e circundando os somas das células piramidais (frecha branca), non hai diferenzas entre os WTM (A) e os HRM (B). Nos detalles C) e D) observamos un punteado no EL(estrela negra) así como inmunopositividade circundando as células piramidais (frecha negra). No XD tamén temos terminais positivas en torno aos somas das células granulares (cabezas de frecha negra) e intensa marcaxe na SGZ e *hilus* (contorno de estrela negra) (E e F). A barra de calibrado equivale a 10 μ m. Abreviaturas: CP: capa piramidal; ER: estrato radiado; EL: estrato lúcido; CG: capa granular; SGZ: zona subgranular; HI: *hilus*.

SYN	WTM	HRM
ER CA1	41,49 ± 2,72	47,54 ± 2,08
ELM	14,04 ± 1,45	16,48 ± 0,95
CMD	35,30 ± 2,63	38,50 ± 2,26
CMM	28,08 ± 1,95	31,77 ± 1,66
CMP	38,70 ± 2,73	42,73 ± 2,21
SGZ	39,66 ± 4,17	49,32 ± 4,04
HILUS	43,64 ± 4,28	52,75 ± 4,26

Táboa 1: Represéntanse os valores de densidade óptica de SYN para cada unha das zonas do hipocampo analizadas. Os valores da T-Student presentan uns niveis de significación de $p > 0,05$.

VGLUT1

A expresión do VGLUT 1 no hipocampo é moi ampla, podemos atopar unha intensa e difusa inmunoreactividade por todas as capas do hipocampo , observamos ademais que no xiro dentado, as porcións distal e proximal da capa molecular aparecen máis intensamente marcadas que a porción medial, como vemos na figura 3A e 3B onde ademais facemos unha comparativa do patrón de expresión entre os ratos WTM e os HRM, dito patrón non difire entre ambos xenotipos.

O VGLUT1 aparece amplamente expresado a excepción das capas celulares, é dicir, na capa piramidal e na capa granular. No EO e ER a marcaxe é moi intensa mentres que na CP só aparece marcaxe en torno aos somas celulares, como podemos ver na figura 4A e 4B onde presentamos a inmunopositividade localizada na CA1, facendo de novo unha comparativa entre ambos xenotipos. Na CA3, observamos o mesmo patrón de expresión que o visto na CA1, o EL presenta unha intensa marcaxe como vemos nas figuras 4C e 4D. Así mesmo, o *hilus* tamén mostra unha intensa marcaxe mentres que a CG non presenta positividade para o VGLUT1, agás as terminais que rodean os somas das células granulares como podemos ver nos detalles 4E e 4F.

Podemos ver os valores de densidade óptica presentados na táboa 2 onde podemos comprobar que efectivamente hai unha redución na intensidade de marcaxe dun 75% no ELM respecto ao ER da CA1 en ambos xenotipos. As restantes capas analizadas presentan unha

intensidade de tinguidura moi semellante entre si. Cando analizamos as posibles diferenzas entre os HRM e os WTM, vemos que en xeral hai unha tendencia ao incremento na densidade óptica nos HRM en comparación cos WTM. No ELM atopamos o maior incremento, dun 25%, pero tamén atopamos os maiores valores de erro estándar, polo que esta diferenza non é estatisticamente significativa. No ER da CA1 así como nas capas do xiro dentado, incluídas as áreas nas que se subdividiu a CM, atopamos incrementos moi tenues de intensidade de marcaxe nos HRM respecto aos WTM. Non se atoparon diferenzas significativas en ningunha destas áreas.

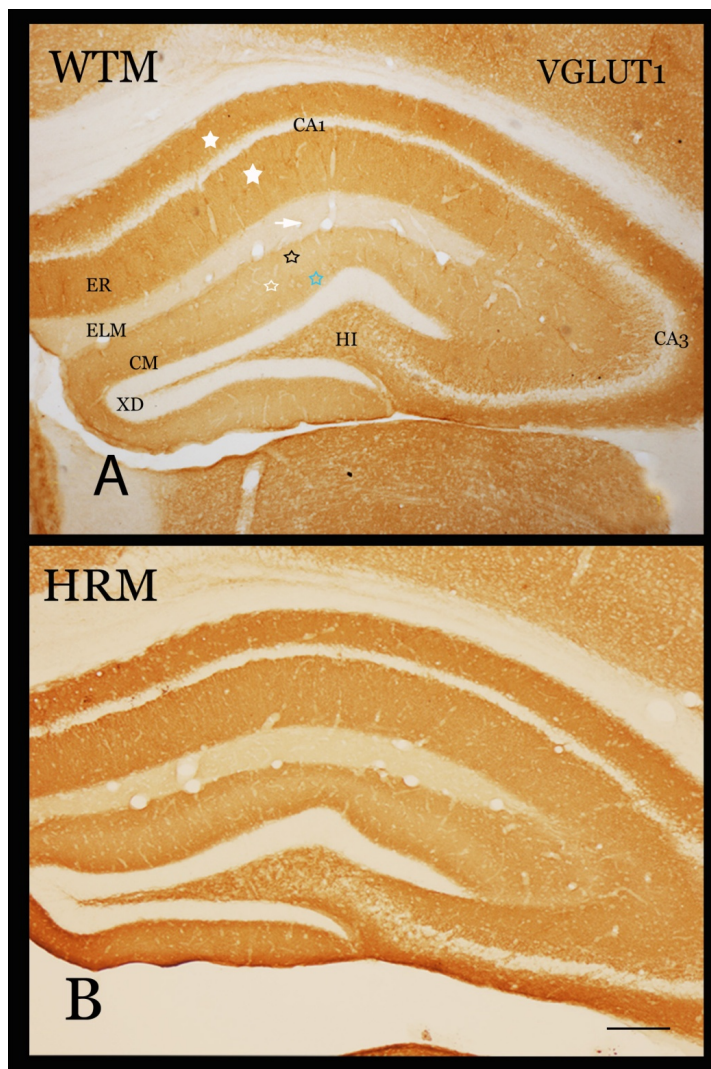


Figura 3: Patrón de expresión do VGLUT1 polas capas do hipocampo e xiro dentado. Non apreciamos diferenzas entre os WTM (A) e os HRM (B). Hai unha intensa marcaxe nas capas do hipocampo (estrelas brancas) aínda que faise máis tenue no ELM (estrela branca). No xiro dentado atopamos que a CM presente diferentes intensidades sendo maior na CMD e na CMP (contorno de estrela negra e azul, respectivamente) e menor na CMM (contorno de estrela branca). A barra de calibrado equivale a 200 μ m. Abreviaturas: ER: estrato radiado; ELM: estrato lacunoso molecular; CMD: capa molecular distal; CMM: capa molecular medial; CMP: capa molecular proximal; XD: xiro dentado; HI: *hilus*.

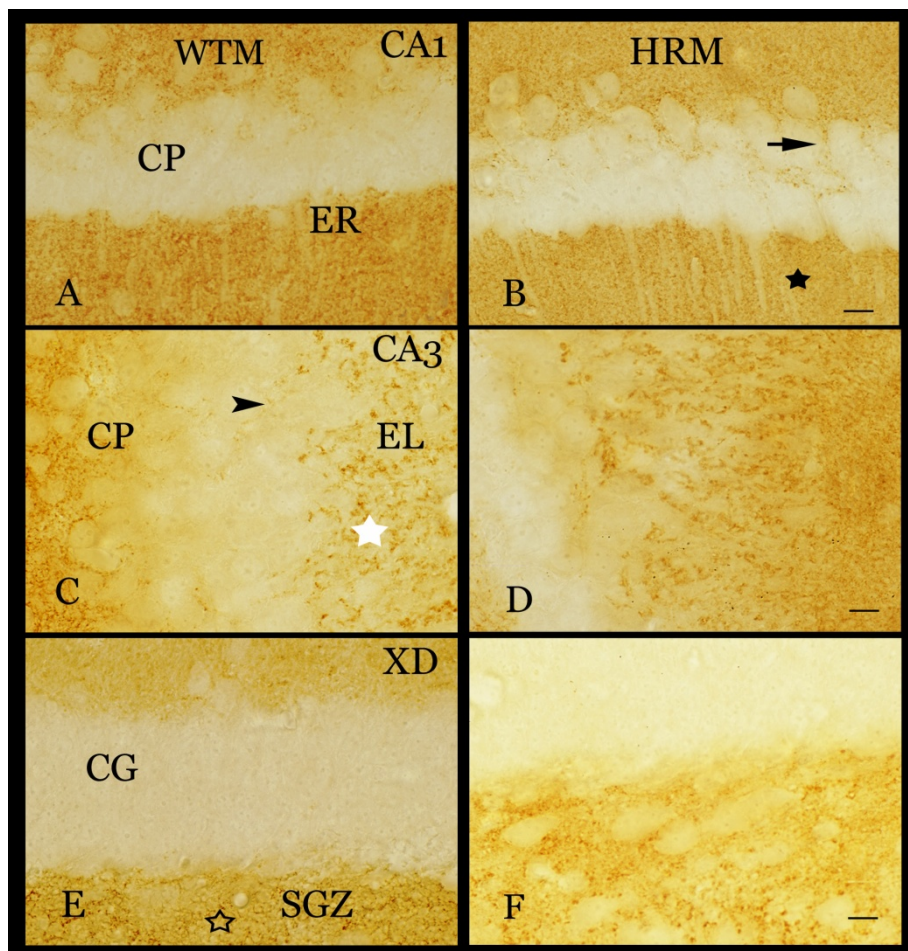


Figura 4: Representamos detalles da expresión do VGLUT1 facendo unha comparativa entre os WTM e os HRM. A) e B) Fotografías da inmunomarcaxe nas capas da CA1 de WTM e HRM. Vemos terminais positivas para o VGLUT1 rodeando os somas das células piramidais e unha intensa e difusa marcaxe no ER (frecha negra e estrela negra, respectivamente). Nos detalles C) e D) podemos ver unha intensa marcaxe na CA3, rodeando os somas das neuronas piramidais (cabezas de frecha negra) e un punteado intenso no EL (frecha branca). Nas figuras E) e F) podemos ver a intensa no xiro dentado, de xeito especial nas capas de neuropilo (contorno de estrela negra). A barra de calibrado equivale a 10 μ m. Abreviaturas: CP: capa piramidal; ER: estrato radiado; EL: estrato lúcido; CG: capa granular; SGZ: zona subgranular.

VGLUT1	WTM	HRM
ER CA1	50,74 ± 2,92	54,79 ± 2,51
ELM	12,41 ± 0,97	15,52 ± 1,44
CMD	49,15 ± 2,14	52,60 ± 2,90
CMM	38,13 ± 2,11	42,40 ± 2,55
CMP	54,37 ± 2,53	58,18 ± 2,85
SGZ	52,05 ± 2,06	56,25 ± 3,27
HILUS	57,47 ± 2,88	65,15 ± 3,00

Táboa 2: Os valores de densidade óptica correspondentes ao VGLUT1 non mostraron diferenzas significativas entre os HRM e os WTM en todas as zonas estudadas. Os datos expresados son a media e o erro estándar da media. T-Student, $p > 0,05$.

VGLUT2

A isoforma 2 do transportador vesicular de glutamato tamén aparece expresada no hipocampo como se mostra nas figuras 5A e 5B. O patrón de distribución do VGLUT2 non difire entre WTM e HRM, tal e como tamén podemos apreciar.

O VGLUT2 non aparece expresado ao longo de toda a capa piramidal senón que a inmunopositividade aparece limitada á capa piramidal correspondente á CA2 e parte da CA3 máis distal respecto ao xiro dentado, vemos unha mostra deste patrón nas figuras 6A e 6B. A inmunohistoquímica permítenos ver un fino punteado correspondente ás terminais sinápticas positivas para o VGLUT2, rodeando as células piramidais da CA2 e da parte adxacente da CA3. O ELM correspondente a esta mesma CA2 así como do CA3 tamén aparece intensamente marcado, mentres o ELM correspondente á CA1 mostra unha marcaxe moito máis tenue.

No xiro dentado o VGLUT2 mostra unha expresión máis ampla, atopamos unha marcaxe difusa nas porcións distal e medial da CM mentres que na porción proximal a marcaxe é case inexistente como podemos ver nos detalles das figuras 6C e 6D. Na CG a marcaxe corresponde a terminais que rodean os somas das células granulares, esta marcaxe faise máis intensa na parte superior limítrofe coa CM e vai perdendo intensidade na parte máis inferior chegando ata a SGZ. No *hilus* non se aprecia marcaxe.

Os valores de densidade óptica presentados na táboa 3 mostran unha variación de intensidade de marcaxe do ELM respecto ao ER do CA2/CA3 de case un 40%. Na zona do ELM correspondente á CA1 podemos atopar un punteado fino no límite entre o ER e o ELM e, de feito, o seu valor de densidade é moito menor en comparación cos valores obtidos a para a mesma capa na CA2 e CA3.

A análise pormenorizada da expresión do VGLUT2 realizada con densidade óptica mostra que non hai unha tendencia clara na variación da intensidade de expresión do VGLUT2 nos HRM respecto aos WTM. Nas capas do hipocampo correspondentes ao ER da CA2 e o ELM da mesma área atopamos unha redución non significativa na densidade óptica nos HRM de en torno a un 10%, mentres no ELM correspondente á CA1 detectamos un incremento nos HRM, que tampouco é significativo. Nas capas do xiro dentado atopamos que na porción distal e medial da CM case non hai diferenza algunha entre os HRM e os WTM, o mesmo ocorre cando analizamos a tinguidura presente na capa granular. Na porción proximal da CM atopamos un incremento moi elevado na intensidade de expresión nos HRM que, non obstante, non resulta estatisticamente significativo.

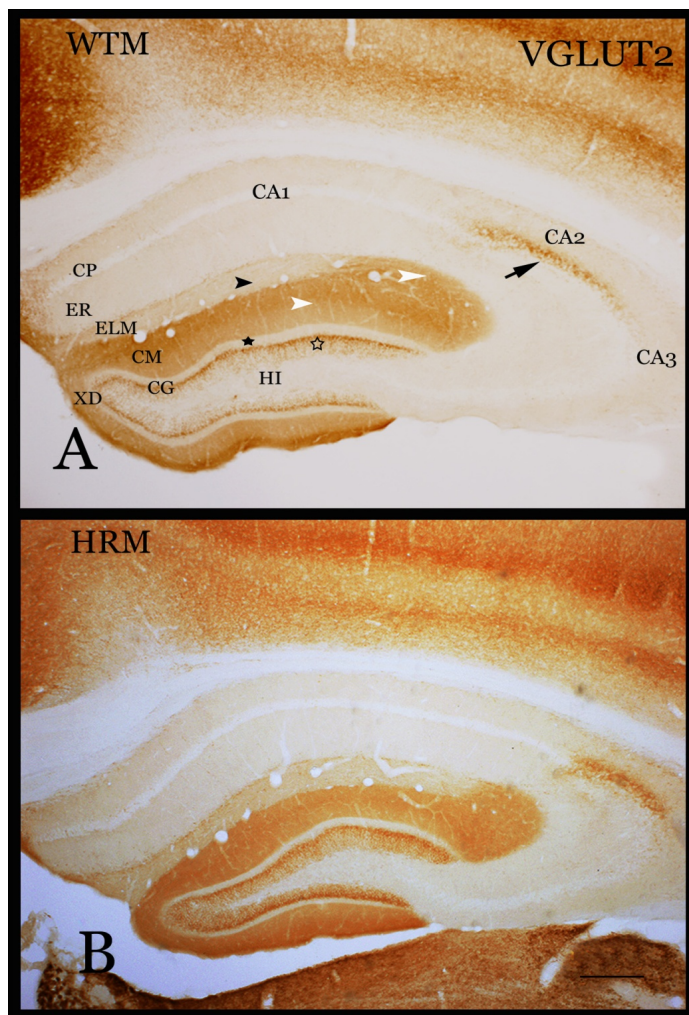


Figura 5: O VGLUT2 aparece expresado en menor medida cás outras isoformas do transportador vesicular de GLU. Nos detalles A) e B) vemos a inmunomarcaxe do VGLUT2 tanto nos WTM como nos HRM. Atopamos que hai unha intensa marcaxe na CA2 na CP (frecha negra). Así mesmo hai unha marcaxe difusa no ELM correspondente á CA2 e CA3 (cabeza de frecha branca). O ELM correspondente á CA1 a marcaxe é máis tenue (cabeza de frecha negra). No xiro dentado atopamos que a CM presenta unha intensa marcaxe especialmente na CMD e CMM (cabeza de frecha branca) mentres que na CMP non atopamos marcaxe (estrela negra). A CG presenta unha intensa marcaxe especialmente no terzo colindante coa CM (contorno de estrela negra). A barra de calibrado equivale a 200 μ m. Abreviaturas: CP: capa piramidal; ER: estrato radiado; ELM: estrato lacunoso molecular; XD: xiro dentado; CM: capa molecular; CMD: capa molecular distal; CMM: capa molecular medial; CMP: capa molecular proximal; CG: capa granular; HI: *hilus*.

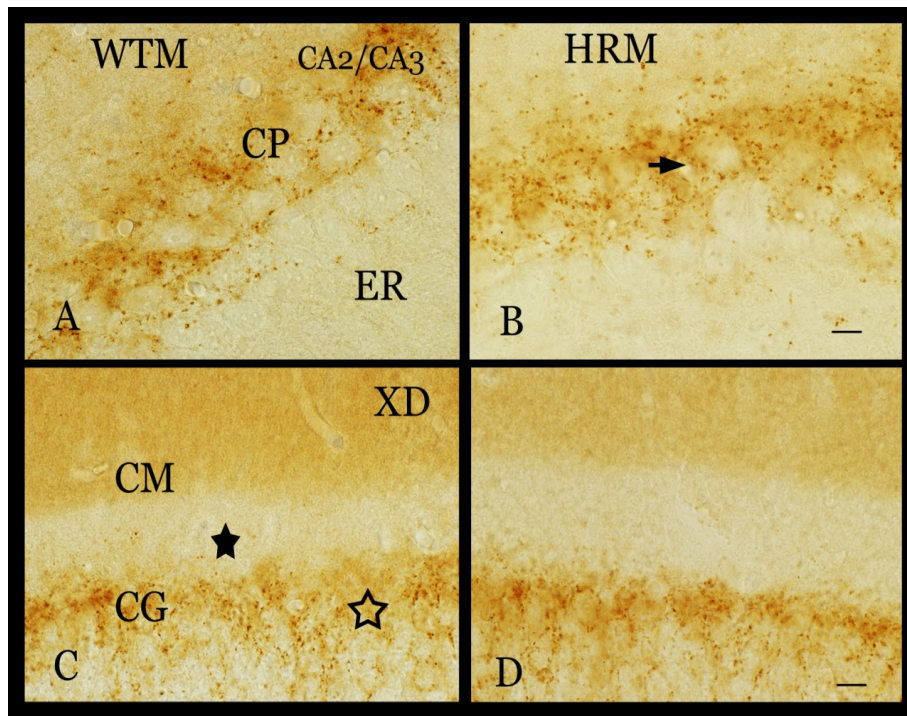


Figura 6: O VGLUT2 visto en detalle parece como un punteado fino sobre os somas das células piramidais (estrela negra) da CA2 e da CA3 na súa rexión máis distal respecto ao xiro dentado. Non hai diferenzas no patrón de expresión entre os WTM (A) e os HRM (B). No xiro dentado aparece como unha marcaxe difusa no CM agás na CMP (estrela negra), onde vemos que case desaparece dita marcaxe. Na CG aparece como un punteado sobre as células granulares, e esta marcaxe faise máis intensa na rexión máis próxima á CM (contorno de estrela negra). Este patrón non difire entre os WTM (C) e os HRM (D). A barra de calibrado equivale a 10 μ m. Abreviaturas: CP: capa piramidal; ER: estrato radiado; XD: xiro dentado; CM: capa molecular; CMD: capa molecular distal; CMM: capa molecular medial; CG: capa granular.

VGLUT2	WTM	HRM
ER CA2	46,51 ± 4,31	41,31 ± 2,83
ELM CA2/CA3	29,11 ± 2,11	26,34 ± 1,99
ELM CA1	7,62 ± 1,24	9,61 ± 1,36
CMD	30,78 ± 2,55	34,25 ± 3,15
CMM	19,15 ± 1,46	20,97 ± 1,51
CMP	3,27 ± 0,70	4,47 ± 1,15
CG	18,05 ± 2,13	18,22 ± 1,61

Táboa 3: Preséntanse os valores de densidade óptica do VGLUT2. As sutís diferenzas observadas non son estatisticamente significativas, os valores de $p > 0,05$.

VGLUT3

O VGLUT3 presenta un patrón de expresión intermedio entre o VGLUT1 e o VGLUT2. Na figura 7 presentamos unha comparación entre o WTM e o HRM e, aínda que o patrón de expresión do VGLUT3 non difire entre ambos xenotipos, poderíamos dicir que nos HRM o nivel de expresión deste marcador é menor.

Nas figuras 7A e 7B podemos atopar o VGLUT3 expresado na capa piramidal da CA1 ata a CA3 en torno aos somas celulares. Tamén aparece unha intensa banda de inmunoreactividade en forma de punteado fino correspondente ao VGLUT3 presente nas terminais sinápticas no ER no seu extremo máis distal limítrofe co ELM. Así mesmo, tamén podemos recoñecer inmunopositividade en terminais sinápticas que aparece distribuídas polas capas do neuropilo tanto da CA1 como da CA3. Por todas as capas podemos ver tamén algún soma tinguido correspondente a unha interneurona. No xiro dentado atopamos marcaxe no extremo superior da CG e unha intensa marcaxe na SGZ.

Na figura 8 presentamos detalles das distintas capas do hipocampo e do xiro dentado. Así mesmo, nas figuras 8A e 8B vemos a intensa marcaxe correspondente ás terminais sinápticas que aparecen rodeando as células piramidais na CA1. Tamén podemos ver en detalle as terminais positivas para o VGLUT3 que aparecen la liña entre o ER máis distal e o ELM. Nos detalles 8C e 8D apreciamos a marcaxe distribuída na CA3 e vemos como, ao igual que na CA1, aparece un

punteado intenso en torno ás células piramidais, así como tamén no ER aínda que nesta área non se aprecia esa marcaxe máis intensa no extremo distal do ER no límite co ELM. Comparando a intensidade de marcaxe entre os WTM e os HRM, podemos advertir certa diminución da mesma nos HRM respecto aos HRM.

Na figura 8E e 8F aparece un detalle do xiro dentado e, ao igual que nas capas anteriores, tamén vemos terminais inmunopositivas para o VGLUT3 dispersas ao longo da CM, tamén rodeando as células granulares e tamén aparecen moi intensamente distribuídas pola SGZ. Así mesmo, polo *hilus* vemos algunha terminal dispersa pero en menor proporción. En comparación entre os WTM e os HRM, parece que existe unha redución da intensidade de marcaxe nos HRM, aínda que o patrón de expresión do VGLUT3 é igual entre ambos xenotipos.

Ao longo das capas do hipocampo así como do xiro dentado vemos algúns somas de interneuronas que aparecen expresando VGLUT3. No detalle 8G vemos unha mostra dunha interneurona GABAérxica no ER, a marcaxe do VGLUT3 aparece circunscrita ao citoplasma, pero o núcleo non presenta positividade. No detalle 8H vemos unha interneurona horizontal situada no límite entre a capa ER e a ELM que tamén presenta marcaxe citoplasmática. No detalle 8I vemos unha mostra dunha interneurona GABAérxica na SGZ que expresa VGLUT3.

Analizando os niveis de expresión do VGLUT3 mediante densidade óptica atopamos que existe unha redución na expresión do

transportador na capa piramidal e no ELM correspondentes á CA1 que oscila entre o 30 e 35%, menos nos HRM respecto aos WTM que resultou ser estatisticamente significativo. Estes valores aparecen representados na táboa 4 e tamén na gráfica 5. Así mesmo, na capa piramidal correspondente á CA3 atopamos unha redución dun 35%, non obstante, non é estatisticamente significativa. No xiro dentado, concretamente na SGZ, detectouse unha expresión do VGLUT3 un 36% menor nos HRM que é estatisticamente significativa.

Non obstante, os valores máis elevados de densidade óptica están presentes nos somas das interneuronas GABAérxicas analizadas, as cales poden presentar ata un 50% máis de intensidade cá marcaxe presente nas terminais sinápticas. Non obstante, non atopamos variacións significativas entre a densidade óptica correspondente a estas interneuronas nos HRM respecto aos WTM tal e como reflicte a táboa 4.

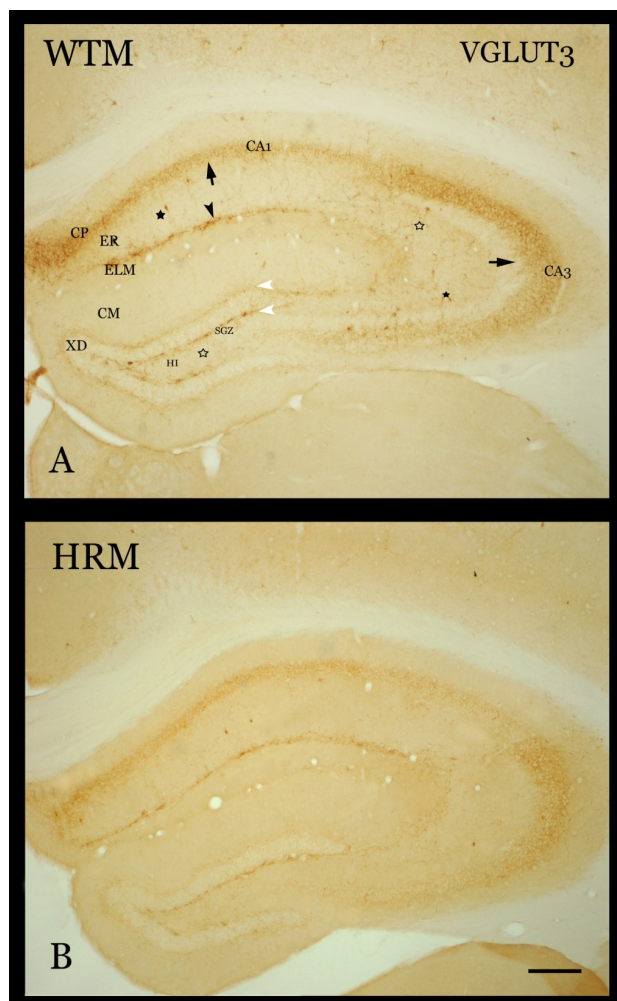


Figura 7: Representación da expresión de VGLUT3. Ten un patrón de expresión intermedio entre o VGLUT1 e o VGLUT2 e ademais dito patrón non difire entre WTM (A) e HRM (B). Atopamos unha intensa marcaxe distribuída na CP ao longo da CA1 e da CA3 (frechas negras). Así mesmo hai inmunopositividade no extremo entre o ER e o ELM (cabeza de frecha negra). No xiro dentado tamén podemos atopar positividade para o VGLUT3 na capa granular limítrofe coa CM e tamén na SGZ (frechas brancas). Ao longo das capas do neuropilo do hipocampo e do xiro dentado tamén podemos atopar dispersas terminais inmunopositivas (estrelas brancas), así mesmo atopamos somas de interneuronas positivas ao longo do hipocampo e do xiro dentado (estrelas negras). Os HRM mostran unha menor intensidade de marcaxe cós WTM. A barra de calibrado equivale a 200 μ m. Abreviaturas: CP: capa piramidal; ER: estrato radiado; ELM: estrato lacunoso molecular; XD: xiro dentado; CM: capa molecular; SGZ: zona subgranular; HI: *hilus*.

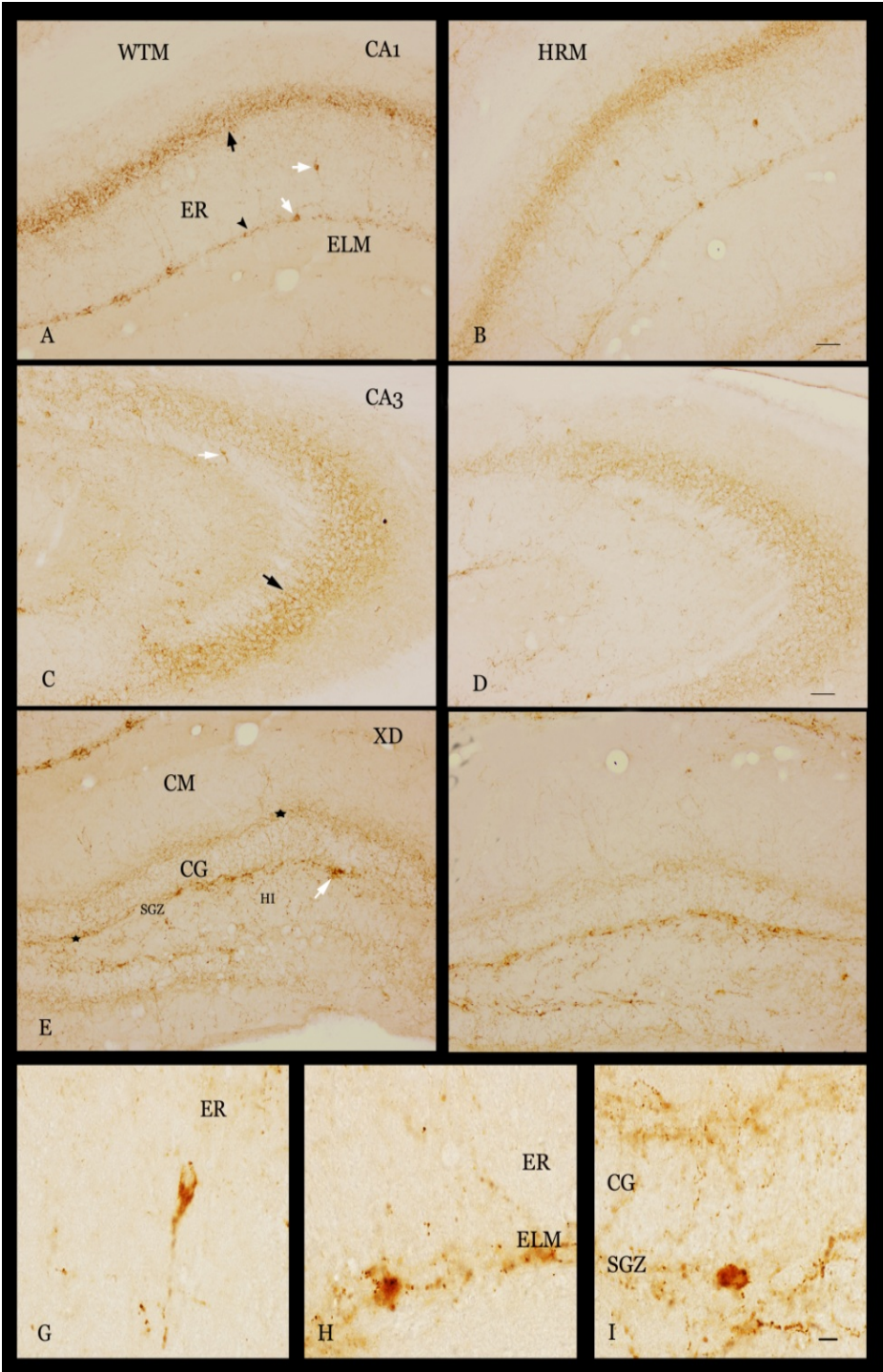
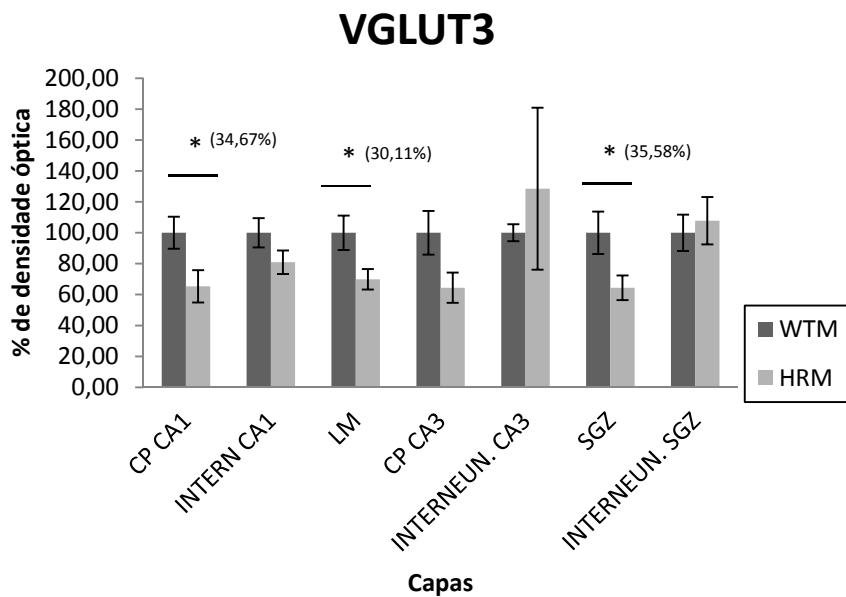


Figura 8: Detalles a maiores aumentos da expresión do VGLUT3. A) e B) Detalles do punteado inmunopositivo en torno aos somas das células piramidais da CA1 e tamén na CA3 (C) e (D) (frechas negras). Ao longo do ER podemos atopar somas de interneuronas positivos para o VGLUT3 (frechas brancas). Na E) e F) presentamos detalles do xiro dentado, onde podemos ver un intenso punteado na rexión da CG limítrofe coa CM, e na SGZ (estrelas negras). Tamén podemos ver somas de interneuronas inmunopositivas na SGZ (frecha branca). G, H e I) Detalles de interneuronas GABAérxicas que presentan inmunopositividade para o VGLUT3 no citoplasma, que aparecen distribuídas polo ER, no ER distal límite co ELM e no SGZ respectivamente. Observamos unha lixeira redución da tinguidura nos HRM respecto aos WTM. A barra de calibrado equivale a 50 μm agás nos detalles G), H) e I) nas cales equivale a 10 μm . Abreviaturas: ER: estrato radiado; ELM: estrato lacunoso molecular; XD: xiro dentado; CM; capa molecular; CG: capa granular; SGZ: zona subgranular; HI: *hilus*.

VGLUT3	WTM	HRM
CP CA1	31,50 ± 3,26	20,58 ± 3,29
INTERN CA1	72,79 ± 6,89	58,91 ± 5,55
ELM	38,40 ± 4,28	26,84 ± 2,53
CP CA3	33,67 ± 4,76	21,70 ± 3,30
INTERNEUN. CA3	68,20 ± 3,75	87,65 ± 35,72
SGZ	33,45 ± 4,60	21,55 ± 2,66
INTERNEUN. SGZ	67,45 ± 7,94	72,71 ± 10,33

Táboa 4 : Os valores de densidade óptica reflicten unha redución de case o 35% na CP da CA1. Unha redución do 30% no ELM da mesma zona e unha redución de case o 36% na SGZ. Nestas áreas a T-Student mostrou unha $p < 0,05$. As demais áreas, como as interneuronas, non amosaron diferenzas. T-Student, $p > 0,05$.



Gráfica 5: Representación gráfica das porcentaxes normalizadas dos valores de densidade óptica para o VGLUT3. * as diferenzas son estatisticamente significativas, T-Student, $p < 0,05$.

5.3- DISCUSIÓN

A análise das posibles alteracións na plasticidade sináptica, realizada con densidade óptica, non permitiu detectar diferenzas entre WTM e HRM na expresión da SYN así como de dúas das isoformas do transportador de glutamato, a VGLUT1 e a VGLUT2. O resultado principal do presente estudo é a diminución significativa dos niveis de VGLUT3 de xeito especial na rexión da CA1: na capa piramidal e no ELM, e tamén no xiro dentado: na SGZ.

O coñecemento previo da existencia de alteracións na morfoloxía neuronal así como unha diminución do número de espiñas dendríticas nos HRM (Liu e cols., 2001), xunto cos traballos realizados en pacientes con esquizofrenia nos que se detectaron baixos niveis de SYN (Eastwood e cols., 2000; Eastwood e Harrison, 2001 e 2005; Webster e cols., 2001; Law e cols., 2004), ademais dunha redución na expresión da reelina moi semellante á observada nos ratos HRM (Tremolizzo e cols., 2002), levounos a pensar que un estudo xeral da expresión de SYN no hipocampo mediante densidade óptica en seccións de inmunohistoquímica tal vez revelaría a existencia de alteracións na expresión deste marcador sináptico nos HRM respecto aos WTM. Non obstante, non atopamos evidencias desta diminución e a razón máis probable deste feito é que as medidas de densidade óptica non ofrecen un poder de detección suficiente como para evidenciar diferenzas que non sexan moi elevadas na SYN (Calhoun e cols., 1996). Aínda así os estudos realizados en humanos presentan certa controversia respecto á

existencia de alteracións na expresión da proteína SYN, xa que por un lado algúns autores apuntan a unha redución da mesma en áreas corticais e talámicas (Davidsson e cols., 1999; Vawter e cols., 1999; Eastwood e cols., 2000; Eastwood e Harrison, 2001 e 2005; Webster e cols., 2001; Law e cols., 2004; Harrison, 2004) namentres que outros autores non atoparon tales alteracións (Vawter e cols., 2002; Chambers e cols., 2005). Por outra banda, recentemente un estudo realizado en ratos HRM tampouco atopou alteracións nos niveis de SYN (Ventruti e cols., 2011) polo que tamén puidera ser que os niveis de reelina observados nos ratos HRM, que oscilan entre un 40% e un 60% respecto ao xenotipo salvaxe, fosen suficientes para que a SYN non mostre alteracións na súa expresión.

Outra posibilidade que podemos considerar é a existencia dunha elevada variabilidade na poboación dos ratos HRM, de tal xeito que os que posúen unha expresión de reelina dun 40% poderían presentar alteracións na expresión de SYN, non obstante, os que posúen un 60% de expresión de reelina presentarían niveis de SYN normais. De feito, algúns estudos de comportamento apuntan á existencia de deficiencias relativamente grandes (Tremolizzo e cols., 2002; Larson e cols., 2003; Tueting e cols., 2006) mentres que outros estudos non evidencian alteracións importantes a nivel de comportamento (Salinger e cols., 2003; Podhorna e Didriksen 2003), polo que se especulou coa posibilidade de que unha razón disto sexa que nos primeiros estudos se seleccionasen ratos HRM con niveis máis baixos de reelina, mentres que nos segundos

se empregasen ratos HRM independentemente da súa dotación de reelina (Tueting e cols., 2006).

Para tratar de discernir as posibles alteracións a nivel de plasticidade sináptica, tamén estudamos mais en detalle o sistema glutamatérxico, para o que empregamos marcadores para as 3 isoformas do transportador vesicular de glutamato.

Por unha banda, a distribución da marcaxe que presentan o VGLUT1 e o VGLUT2 é semellante entre ratos WTM e HRM, e en ambos casos coincide co patrón de distribución previamente publicado en ratas e en ratos (Fremeau e cols., 2001; Herzog e cols., 2006). Existe unha distribución complementaria do VGLUT1 e do VGLUT2 no hipocampo, de tal xeito que o VGLUT1 aparece en terminais sinápticas que contactan con dendritas mentres que o VGLUT2 aparece nas terminais sinápticas que establecen conexións cos somas neuronais (Fremeau e cols., 2004).

No presente estudo non atopamos diferenzas significativas entre os HRM e os WTM nos niveis de expresión do VGLUT1 e 2. Ata o noso coñecemento non existen estudos previos sobre a posible alteración dos VGLUT nos ratos HRM, non obstante, podemos atopar estudos en pacientes con esquizofrenia que mostran unha redución na expresión do VGLUT1 no hipocampo (Harrison e cols., 2006; Reynolds e Harte, 2007), así mesmo parece que o VGLUT2 non estaría alterado nesta doenza psiquiátrica. Existe certa controversia respecto ás posibles alteracións na expresión dos transportadores de glutamato, posto que tamén existen resultados que presentan unha ausencia das mesmas (Uezato e cols.,

2009). Tal e como discutimos para o caso da SYN, é posible que a ausencia de diferenzas para o VGLUT1 sexa debida á baixa capacidade de detección do método empregado, de tal xeito que en caso de existir diferenzas, estas sexan demasiado sutís como para ser detectadas mediante densidade óptica, ou puidera ocorrer que os niveis de reelina expresados polos HRM sexan suficientes para manter un nivel adecuado de expresión destes transportadores. No caso concreto do VGLUT2 parece claro a non existencia de alteracións na súa expresión en esquizofrenia e a falta de máis estudos que confirmen este resultado, tal vez poderíamos dicir que as alteracións na expresión de reelina non teñen efecto sobre a expresión do VGLUT2 (Harrison e cols., 2003; Eastwood e Harrison, 2004).

No caso do VGLUT3 atopamos unha redución significativa nos HRM respecto aos WTM nas principais capas do hipocampo e do xiro dentado, en concreto no SGZ. O VGLUT3 é un marcador vesicular de glutamato que parece estar expresado en terminais que non só son glutamatérxicas senón que tamén podemos atopalo en terminais monoaminérxicas: serotoninérxicas, dopaminérxicas, noradrenérxicas e colinérxicas (Gras e cols., 2002; Seal e Edwards., 2006; Amilhon e cols., 2010). Así mesmo, tamén se localiza en somas de interneuronas GABAérxicas, en concreto, nas que expresan colecistoquinina (Somogyi e cols., 2004; Seal e Edwards, 2006). O VGLUT3 tamén está estreitamente relacionado co sistema serotoninérxico porque actúa estimulando a liberación de serotonina, así en ausencia do VGLUT3 tamén se motiva

unha redución do receptor de serotonina 1A (5HT1A), o cal relacionouse con procesos de ansiedade e depresión, de feito os ratos que non expresan VGLUT3 presentan alteracións no comportamento como neofobia (Amilhon e cols., 2010), característica que tamén presentan os ratos heterocigotos *reeler* (Tueting e cols., 2006). Isto é de particular interese para os nosos experimentos xa que algunhas destas células inmunopositivas para VGLUT3 e colecistokinina (Somogyi e cols., 2004) é posible que correspondan ás células piramidais en cesto que expresan reelina e que, como dixemos anteriormente son especialmente sensibles ao tratamento con CORT. O tratamento prolongado con CORT, ou situacións estresantes crónicas, poderían implicar: por un lado, alteracións na integración das novas neuronas no xiro dentado e paralelamente unha dexeneración de células piramidais en cesto reelina positivas; e por outro lado, a redución no VGLUT3 detectada nos HRM, tendo en conta que as células que o expresan poderían ser as que tamén expresan reelina, daría lugar a unha regulación á baixa dos receptores 5HT1A que producirían alteracións no sistema serotoninérxico.

Todo isto en conxunto, suxírenos que as alteracións en neuroxénese e as alteracións a nivel da plasticidade sináptica, serían subxacentes ás alteracións a nivel de comportamento presentes nos HRM *per se* e cando son tratados con CORT.

Conclusiones

- 🐭 Os ratos heterocigotos *reeler*, nos que hai unha redución da expresión da proteína reelina de entre o 40% e o 60%, presentan unha maior vulnerabilidade para síntomas depresivos tras recibir doses crónicas de corticosterona. Tras a administración de corticosterona durante un período de 21 días, mostran un comportamento semellante ao depresivo cando son sometidos a probas como a natación forzada, onde mostran un maior tempo de inmovilidade cós ratos de xenotipo salvaxe que recibiron a mesma dose de corticosterona.
- 🐭 Nin os ratos heterocigotos *reeler* nin os ratos de xenotipo salvaxe que recibiron corticosterona, presentan alteracións na locomoción ou ansiedade cando se someten á proba do campo aberto, nin tampouco anhedonia cando se lles realiza o test da sacarosa.
- 🐭 Os ratos heterocigotos *reeler* son máis vulnerables fronte aos efectos da administración de corticosterona cós ratos de xenotipo salvaxe a nivel de neuroxénese, posto que presentan unha redución do número de células que expresan dobrecortina, a cal aparece en células que se forman de novo na zona subgranular. Os ratos de xenotipo salvaxe que reciben a mesma dose non presentan dita redución nos niveis de neuroxénese.
- 🐭 Os ratos heterocigotos *reeler* tamén presentan alteracións a nivel do grado de maduración das células que se forman de novo. Os ratos heterocigotos *reeler* que recibiron a dose de 20 mg/kg presentan un

incremento de células formadas de novo que carecen de ramificacións dendríticas.

☞ Os ratos heterocigotos *reeler* presentan unha redución no número de células reelina positivas localizadas na zona subgranular e no *hilus* do xiro dentado de xeito máis significativo cando se lles inxectan doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg de corticosterona.

☞ A reelina e a óxido nítrico sintetase neuronal aparecen expresadas en interneuronas GABAérxicas, e colocalizan nunha subpoboación destas interneuronas ao longo das capas do hipocampo e do xiro dentado, agás no estrato oriens.

☞ A colocalización entre a reelina e a nNOS aparece reducida un 45% nas células piramidais en cesto localizadas na zona subgranular e un 40% nas interneuronas GABAérxicas localizadas na capa molecular do xiro dentado dos ratos heterocigotos *reeler*.

☞ A corticosterona, administrada na dose de 20 mg/kg durante un período de 21 días, inflúe sobre a subpoboación de células piramidais en cesto localizada na zona subgranular do xiro dentado, que expresa reelina e nNOS, causando unha redución significativa na colocalización de ambas proteínas nos ratos de xenotipo salvaxe, polo que a reelina podería estar actuando como neuroprotector fronte á excitotoxicidade causada polo incremento de óxido nítrico.

☞ Nos ratos heterocigotos *reeler* a administración de corticosterona causa un incremento na colocalización da reelina e da nNOS na

subpoboación de células piramidais en cesto localizada na zona subgranular, polo que o incremento da expresión de nNOS podería xogar un papel importante na redución da neuroxénese e tamén nas alteracións a nivel de comportamento que presentan estes animais cando reciben corticosterona.

🐭 No estudo das posibles alteracións a nivel de plasticidade sináptica nos heterocigotos *reeler* como consecuencia da menor expresión de reelina empregouse a sinaptofisina, e a análise mediante densidade óptica non amosou alteracións na expresión de dita proteína.

🐭 A análise específica do sistema glutamatérxico realizouse mediante o estudo da expresión das isoformas 1 e 2 do transportador vesicular de glutamato, estas análises non presentan alteracións en ambas isoformas nos ratos heterocigotos *reeler* respecto aos ratos de xenotipo salvaxe.

🐭 Empregouse a isoforma 3 do transportador de glutamato e apreciouse unha redución da expresión de dita isoforma nas terminais sinápticas que se localizan nas capas celulares do hipocampo e do xiro dentado dos ratos heterocigotos *reeler*. Esta redución podería estar implicada nas alteracións de comportamento e de aprendizaxe que mostran estes animais.

🐭 Ao igual que se veu nos pacientes con esquizofrenia e depresión, os ratos heterocigotos *reeler* presentan: por un lado, unha menor expresión de reelina, e por outro, cando se lles administra unha

dose elevada de corticosterona mostran características do comportamento que semellan ao depresivo, acompañado dunha redución no número de células que expresan reelina, dun incremento na expresión de nNOS e dunha redución nos niveis de neuroxénese e do grao de maduración das células formadas de novo. Polo tanto, o rato heterocigoto *reeler* en se mesmo e cando se lle inxecta CORT poderían considerarse como dous posibles modelos animais adecuados para estudar estas enfermidades psiquiátricas.

Relación dos artigos derivados desta tese doutoral

👉 **Romay-Tallón, R.**, Dopeso-Reyes G., I., Lussier L., A., Kalynchuk, L.E., Caruncho, H.J. (2010). The coexpression of reelin and neuronal nitric oxide synthase in a subpopulation of dentate gyrus neurons is downregulated in heterozygous reeler mice. *Neural Plasticity* 2010, doi: 10.1155/2010/130429.

👉 Lussier, A.L.¹, **Romay-Tallón, R.¹**, Kalynchuk, L.E.¹, Caruncho, H.J.¹ (2010). Reelin is a putative vulnerability factor for depression: examining the depressogenic effects of repeated corticosterona in heterozygous reeler mice. *Neuropharmacology* 60, 1064-1074.¹ implica o mesmo grado de colaboración de todos os asinantes.

Outros artigos

👉 Baltanás-Rivera, T., **Romay-Tallón, R.**, Dopeso-Reyes G., I., Caruncho, H.J. (2010). Serotoning transporter clustering in blood lymphocytes of reeler mice. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology* 2010, doi:10.1155/2010/396282.

👉 Chronic corticosterone exposure alters GABAergic and glutamatergic activity within the rat hippocampus and amygdala: relevance to depression. April L Lussier ; **Raquel Romay-Tallon** ; Hector J Caruncho ; Lisa E Kalynchuk. Enviado a *Neuropharmacology*.

Bibliografía

- **Abraham, H., Meyer, G.** (2003). Reelin-expressing neurons in the postnatal human hippocampal formation. *Hippocampus* 13, 715-727.
- **Akbarian, S., Viñuela, A., Kim, J.J., Potkin, S.G., Bunney, W.E. Jr., Jones, E.G.** (1993). Distorted distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase neurons in temporal lobe of schizophrenics implies anomalous cortical development. *Archives of General Psychiatry*, 50, 178-187.
- **Alcántara, S., Pozas, E., Ibáñez, C.F., Soriano, E.** (2006). BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization. *Cerebral Cortex* 16, 487-499.
- **Alcántara, S., Ruíz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., Soriano, E.** (1998). Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *Journal of Neuroscience* 18, 7779-7799.
- **Amaral, D., Lavenex, P.** (2007). Hippocampal Neuroanatomy. En "The Hippocampus Book". Andersen, Morris, R; Amaral, D.; Bliss, T.; O'Keefe, J. (Ed. Oxford University Press), *Capítulo 3*, pp: 37 -110.
- **Amilhon, B., Lepicar, É., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., Miot, S., Gras, Ch., Gardier, A.M., Gallego J, Hamon, M., Lanfumey, L., Gasnier, B., Giros, B., Mestikawy, S.E.** (2010). VGLUT3 (Vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the

- regulation of serotonergic transmission and anxiety. *Neurobiology of Disease* 30, 2198-2210.
- **Anderson, I., Pilling, S., Barnes, A., Bayliss, L., Bird, V., Burbeck, R. Chew-Graham, C., Clarke, J., Dyer, M., Flanagan, E., Harris, C., Hopkins, S., Kenwright M., Kuyken, W., Lewis, A., Lewis, G., Li, R., Masterson, B., Meader, N., Meudell, A., Mitchell, A., Moore, R., Omarjee, S., Paton, C., Perez, A., Retsa, P., Rizzo, M., Robertson, J., Saunders, R., Sealey, C., Shackleton, B., Shackleton, T., Stockton, S., Taylor, C., Wood, J.** (2010). Depression. The Nice Guideline on the Treatment and Management of Depression in Adults. Update Version. National Collaborating Centre for Mental Health. (ed. The British Psychological Society and The Royal College of Psychiatrists), *Capítulo 2*.
 - **Badea, A., Nicholls, P.J., Johnson, G.A., Wetsel, W.C.** (2007). Neuroanatomical phenotypes in the *Reeler* mouse. *NeuroImage* 34, 1363-1374.
 - **Ballmaier, M., Zoli, M., Leo G., Agnati, L.A., Spano, P.** (2002). Preferential alterations in the mesolimbic dopamine pathway of heterozygous *reeler* mice: an emerging animal-based model of schizophrenia. *European Journal of Neuroscience* 15, 1197-1205.
 - **Balu, D., Lucki, I.** (2008). Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications and contribution to disease pathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33, 232-252.

- **Barco, A., Bailey, C.H., Kandel, E.R.** (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *Journal of Neurochemistry* 97, 1520-1533.
- **Barr, A.M., Fish, K.N., Markou, A., Honer, W.G.** (2008). Heterozygous *reeler* mice exhibit alterations in sensorimotor gating but non presynaptic proteins. *European Journal of Neuroscience* 27, 2568-2574.
- **Beffert, U., Morfini, G., Bock, H.H., Reyna, H., Brady, S.T., Herz, J.** (2002). Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3 beta. *Journal of Biological Chemistry* 277, 49958-49964.
- **Borrell, V., Del Rio, J.A., Alcántara, S., Derer, M., Martínez, A., D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Derer P., Curran, T., Soriano, E.** (1999). Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections. *Journal of Neuroscience* 15, 1345-1358.
- **Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Rampon, C., Laroche, S.** (2006). Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 26, 5888-5893.
- **Brummelte, S., Galea, L.M.** (2010). Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats. *Neuroscience* 168, 680-690.

- **Burke, H., Davis, M.C., Otte, C., Mohr, D.C.** (2005). Depression and cortisol responses to psychological stress: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 30, 846-856.
- **Calhoun, E.M., Jucker, M., Martin, L.J., Thinakaran, G., Price, D.L., Mouton, P.R.** (1996). Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of Neurocytology* 25, 821-828.
- **Carboni, G., Tueting, P., Tremolizzo, L., Sugaya, I., Davis, J., Costa E., Guidotti A.** (2004). Enhanced dizocilpine efficacy in heterozygous *reeler* mice relates to GABA turnover downregulation. *Neuropharmacology* 46, 1070-1081.
- **Chambers, J.S., Thomas, D., Saland, L., Neve, R.L., Perrone-Bizzozero, I. N.** (2004). Growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin alterations in the dentate gyrus of patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29, 283– 290.
- **Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T-S., Kavalali, E.T., Bezprozvanny, I., Herz, J.** (2005). Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *Journal of Neuroscience* 25, 8209-85016.
- **Chun, S.K., Sun, W., Jung, M.W.** (2009). LTD induction suppresses LTP-induced hippocampal adult neurogenesis. *Neuroreport* 20, 1279-1283.

- **Chun, S.K., Sun, W., Park, J-J., Jung, M.W.** (2006). Enhanced proliferation of progenitor cells following long-term potentiation induction the rat gyrus. *Neurobiology of Learning and Memory* 86, 322-329.
- **Costa, E., Davis, J., Grayson, D.R., Guidotti, A., Pappas, G.D., Pesold, C.** (2001). Dendritic spine hypoplasticity and downregulation of reelin and GABAergic tone in schizophrenia vulnerability. *Neurobiology of Disease* 8, 723-742.
- **Costa, E., Davis, J., Pesold, C., Tueting, P., Guidotti, A.** (2002). The heterozygote *reeler* mouse as a model for the development of a new generation of antipsychotics. *Current Opinion in Pharmacology* 2, 56-62.
- **Cryan, J.F., Mombereau, C.** (2004). In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry* 9, 326-357.
- **D'Aquila, P., Monleon, S., Borsini, F., Brain, P., Willner, P.** (1997). Anti-anhedonic actions of the novel serotonergic agent flibanserin, a potential rapidly-acting antidepressant. *European Journal of Pharmacology* 340, 121-132.
- **D'Arcangelo, G.** (2006). Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy & Behavior* 8, 81-90.

- **D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S-C, Soares, H.D., Morgan, J.I., Curran, T.** (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature* 374, 719-723.
- **Dalm, S., de Visser, L., Spruijt, B.M, Oitzl, M.S.** (2009). Repeated rat exposure inhibits the circadian activity patterns of C57BL/6J mice in the home cage. *Behavioural Brain Research* 196, 84-92.
- **David, D.J, Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I.** (2008). Neurogenesis dependent and independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479-493.
- **Davidsson, P., Gottfries, J., Bogdanovic, N., Ekman, R., Karlsson, I., Gottfries, C-G., Blennow, K.** (1999). The synaptic-vesicle-specific proteins rab3a and synaptophysin are reduced in thalamus and related cortical brain regions in schizophrenic brains. *Schizophrenia Research* 40, 23-29.
- **DeCarolis, N.A., Eisch, A.J.** (2010). Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: A critical evaluation. *Neuropharmacology* 58, 884-893.
- **Dong, E., Caruncho, H.J., Liu, W.S., Smalheiser, N.R., Grayson, D.R., Costa, E., Guidotti, A.** (2003). A reelin-integrin receptor interaction regulates ARC mRNA translation in synaptoneurosome.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 100, 5479-5484.
- **Doucet, M.V., Harkin, A., Dev, K.K.** (2012). The PSD-95/nNOS complex: New drugs for depression?. *Pharmacology & Therapeutics* 133, 218-229.
 - **Dranovsky, A., Hen, R.** (2006). Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biological Psychiatry* 59, 1136-1143.
 - **Duman, R.S.** (2002). Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *European Psychiatry* 17, 306-310.
 - **Dun, N.J., Dun, S.L., Wong, R.K., Forstermann U.** (1994). Colocalization of nitric oxide synthase and somatostatin immunoreactivity in rat dentate hilar neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 2955-2959.
 - **Dwivedi, Y.** (2009). Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 5, 433-449.
 - **Eastwood, S.L., Harrison, P.J.** (2001). Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexins. *Brain Research Bulletin* 55, 569-578.

- **Eastwood, S.L., Harrison, P.J.** (2005). Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNA in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. *Schizophrenia Research* 73, 159-172.
- **Eastwood, S.L., Harrison, P.J.** (2006). Cellular basis of reduced cortical reelin expression in schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry* 163, 540-542.
- **Eastwood, S.L., Harrison, P.J., Cairns, N.J.** (2000). Synaptophysin gene expression in schizophrenia: investigation of synaptic pathology in the cerebral cortex. *The British Journal of Psychiatry* 176, 236-242.
- **Fatemi, H.S., Stary, M.J., Earle, J.A., Araghi-Niknam, M., Eagan, E.** (2005). GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and reelin proteins in cerebellum. *Schizophrenia Research* 72, 109-122.
- **Fatemi, S.H.** (2001). Reelin mutation in mouse and man: from reeler mouse to schizophrenia, mood disorders, autism and lissencephaly. *Molecular Psychiatry* 6, 129-133.
- **Fatemi, S.H.** (2011). Reelin, a marker of stress resilience in depression and psychosis. *Neuropsychopharmacology* 36, 2371-2372.

- **Fatemi, S.H., Earle, J.A., McMenomy, T.** (2000). Reduction in reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Molecular Psychiatry* 5, 654-663.
- **Fava, M., Kendler, K.S.** (2000). Major depressive disorder. *Neuron* 28, 335-341.
- **Förster, E., Jossin, Y., Zhao, S., Chai, X., Frotscher, M., Goffinet, A.M.** (2006). Recent progress in understanding the role of reelin in radial neuronal migration, with specific emphasis on the dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience* 23, 901-909.
- **Fournier, N.M., Andersen, D.R., Boterill, J.J., Sterner, E.Y., Lussier, A.L., Caruncho H.J., Kalynchuk, L.E.** (2010). The effect of amygdala kindling on hippocampal neurogenesis coincides with decreased reelin and DISC1 expression in the adult dentate gyrus. *Hippocampus* 20, 659-671.
- **Fournier, N.M., Duman, R.S.** (2012). Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: Implications for the pathophysiology and treatment of depression. *Behavioural Brain Research* 227, 440-449.
- **Freneau, R.T., Burman, J., Qureshi, T., Tran C.H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Reimer, R.J., Chaudhry, F.A, Edwards, R.H.** (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests

- novel modes of signaling by glutamate. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 99, 14488-14493.
- **Freneau, R.T., Troyer, M.D., Pahner, I., Nygaard, G.O., Tran, C.H., Reimer, R.J., Bellochio, E.E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., Edwards, R.H.** (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31, 247-260.
 - **Freneau, R.T., Voglmaier, S., Seal, R.P., Edwards, R.H.** (2004). VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends in Neurosciences* 27, 98-103.
 - **Gilmore, E.C., Herrup, K.** (2000). Cortical development: receiving reelin. *Current Biology* 10, 162-166.
 - **Gong, C., Wang, T.W., Huang, H.S., Parent, J.M.** (2007). Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *Journal of Neuroscience* 27, 1803-1811.
 - **Gotti, S., Sica, M., Viglietti-Panzica, C., Panzica, G.** (2005). Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microscopy Research and Technique* 68, 13-35.
 - **Gourley, S.L., Kiraly, D.D., Howell, J.L., Olausson, P., Taylor, J.R.** (2008). Acute hippocampal BDNF restores motivational and forced swim performance after corticosterone. *Biological Psychiatry* 64, 884-890.

- **Gras, C., Herzog, E., Bellenchi G, C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier B., Giros, B., Mestikawy, S.E.** (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *Journal of Neuroscience* 22, 5442-5451.
- **Gregus, A., Wintink, A.J., Davis, A.C., Kalynchuk, L.E.** (2005). Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behavioural Brain Research* 156, 105-114.
- **Groc, L., Choquet, D., Stephenson, A., Verrier, D., Manzoni, O.J., Chavis, P.** (2007). NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein reelin. *Journal of Neuroscience* 27, 10165-10175.
- **Gross, C.M., Flubacher, A., Tinnes, S., Heyer, A., Scheller, M., Herpfer, I., Berger, M., Frostscher, M., Liber, K., Hass, C.A.** (2012). Early life stress stimulates hippocampal reelin gene expression in a sex-specific manner: evidence for corticosterone-mediated action. *Hippocampus* 22, 409-420.
- **Guidotti, A., Auta, J., Davis, J.M., DiGiorgi Gerevini, V., Dwivedi, Y., Grayson, D.R., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesol, C., Sharma, R., Uzunov, D., Costa, E.** (2000). Decrease in reelin and glutamatic acid decarboxylase 67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder. *Archives of General Psychiatry* 57, 1061-1069.

- **Hafner, H., Maurer, K., Trendler, G., der Heiden, W., Schmidt, M., Konnecke, R.** (2005). Schizophrenia and depression: challenging the paradigm of two separate diseases a controlled study of schizophrenia, depression and healthy controls. *Schizophrenia Research* 77, 11-24.
- **Halasy, K., Hajszan, T., Kovács, É.G., Lam, T-T., Leranth, C.** (2004). Distribution and origin of vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive fibers in the rat hippocampus. *Hippocampus* 14, 908-918.
- **Harkin, A., Connor, T.J., Walsh, M., St.John, N., Helly, J.P.** (2003). Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology* 44, 616-623.
- **Harrison P.J.** (2004). The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology* 174, 151-162.
- **Harrison, P.J., Eastwood, S.L.** (2001). Neuropathological studies of synaptic connectivity in the hippocampal formation in schizophrenia. *Hippocampus* 11, 508-519.
- **Harrison, P.J., Law, A.J., Eastwood, S.L.** (2003). Glutamate receptors and transporters in the hippocampus in schizophrenia. *Annals New York Academy of Science* 1003, 94-101.

- **Harrison, P.J., Law, A.J., Eastwood, S.L.** (2006). Glutamate receptors and transporters in the hippocampus in schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Science* 1003, 94-101.
- **Harvin, A.J., Bruce, K.H., Craft, B., Paul, I.A.** (1999). Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. *European Journal of Pharmacology* 372, 207-213.
- **Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D.C., Culliman, W.E.** (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology* 24, 151-180.
- **Herrmann, G., Hlushchuk, R., Baum, O., Scotti, A.L.** (2007). Nitric oxide synthase protein levels, not the mRNA, are downregulated in olfactory bulb interneurons of *reeler* mice. *Journal Chemical Neuroanatomy* 33, 87-96.
- **Herrmann, G., Mishev, G., Scotti, A.L.** (2008). Olfactory bulb interneurons releasing NO exhibit the reelin receptor ApoEr2 and part of those targets by NO express reelin. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 36, 160-169.
- **Herz, J., Chen, Y.** (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 7,850-859.

- **Herzog, E., Takamori, S., Jahn, R., Brose, N., Wojcik, S.M.** (2006). Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 99, 1011-1018.
- **Hevner, R.F., Hodge, R.D., Daza, A.M.R., Englund, C.** (2006). Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neuroscience Research* 55, 223-233.
- **Impagnatiello, F., Guidotti, A.R., Pesold, Ch., Dwivedi, Y., Caruncho, H., Pisu, M.G., Uzunov, D.P., Smalheiser N.R., Davis, J.M., Pandey G.N., Pappas, G.D., Tueting, P., Sharma, R.P., Costa, E.** (1998) A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 95, 15718-15723.
- **Isosaka, T., Hattori, K., Yagi, T.** (2006). NMDA-receptor proteins are upregulated in the hippocampus of postnatal heterozygous *reeler* mice. *Brain Research* 1073-1074, 11-19.
- **Jacobs, B.L.** (2002). Adult brain neurogenesis and depression. *Brain Behavioral Immunology* 16, 602-206.
- **Jacobs, B.L., van Praag, H., Gage, F.H.** (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Molecular Psychiatry* 5, 262-269.

- **Jinno, S., Kinukasa, N., Kosaka, T.** (2001). Morphometric multivariate analysis of GABAergic neurons containing calretinin and neuronal nitric oxide synthase in the mouse hippocampus. *Brain Research* 900, 195-201.
- **Jinno, S., Kosaka, T.** (2002) Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. *Journal of Comparative Neurology* 119, 1-25.
- **Joëls, M.** (2008). Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 583, 312-321.
- **Johnson, S.A., Fournier, N.M., Kalynchuk, L.E.** (2006). Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behavioral Brain Research*. 168, 280-288.
- **Johnston, D., Amaral, D.G.** (2004). Hippocampus. En "The Synaptic Organization of the Brain". Shephard, GM. (Ed. Oxford University Press), pp: 455-498.
- **Joon Won, S., Kim, S.H., Xie, L., Wang, Y., Mao, X.O., Jin, K., Greenberg, D.A.** (2006). Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size. *Experimental Neurology* 198, 250-259.

- **Jossin, Y., Bar, I., Ignatovia, N., Tissir, F, Lambert de Rouvroit, C., Goffinet, A.M.** (2003). The reelin signaling pathway: some recent developments. *Cerebral Cortex* 13, 627-633.
- **Judaš, M, Šestan, N., Kostovič, I.** (1998). Nitrinergic neurons in the developing and adult human telencephalon: transient and permanent patterns of expression in comparison to other mammals. *Microscopy Research and Technique* 45, 401-419.
- **Kalynchuk, L.E., Gregus, A., Boudreau, D., Perrot-Sinal, T.S.** (2004). Corticosterone Increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats. *Behavioral Neuroscience* 118, 1365-1377.
- **Kandel, E.** (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.
- **Karten, Y.J.G., Nair, S.M., Essen, v., Sibug, R., Joëls, M.** (1999). Long-term exposure to high corticosterone levels, attenuates serotonin responses in rat hippocampal CA1 neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 13456-13461.
- **Keilani, S., Healey, D., Sugaya, K.** (2012). Reelin regulates differentiation of neuronal stem cells by activation of notch signaling trough Disabled-1 tyrosine phosphorylation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 90, 361-369.

- **Kelley, J.B., Anderson, K.L., Itzbak, Y.** (2010). Pharmacological modulators of nitric oxide signaling and contextual fear conditioning in mice. *Psychopharmacology* 210, 65-74.
- **Kelley, J.B., Balda, M.A., Anderson, K.L., Itzbak, Y.** (2009). Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene. *Learning and Memory* 16, 371-378.
- **Kempermann, G.** (2002a) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience* 22, 635-638.
- **Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, H.F.** (2002b). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development and Disease* 130, 391-399.
- **Kempermann, G., Kronenberg, G.** (2003). Depressed new neurons?. Adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biological Psychiatry* 54, 499-503.
- **Kerzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzrelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P., El Mestikawy, S.** (2004). Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123, 983-1002.
- **Kim, J.J., Yoon, K.S.** (1998). Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends in Neuroscience* 21, 505-509.

- **Knable, M.B., Barci, B.M., Webster, M.J., Meador-Woodruff, J., Torrey, E.F.** (2004). Molecular Abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Molecular Psychiatry* 9, 609-620.
- **Kovács, R., Rabanus, A., Otáhal, J., Patzak, A., Kardso, J., Albus, K., Heineman, U., Kan, O.** (2009). Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices. *Journal of Neuroscience* 29, 8565-8577.
- **Krugers, H.J., Alfarez, D.N., Karst, H., Parashkouhi, K., van gemert, N., Joëls, M.** (2005). Corticosterone shifts different forms of synaptic potentiation in opposite directions. *Hippocampus* 15, 697-703.
- **Lambert De Rouvroit, C., Goffinet, A.** (1998). The *reeler* mouse as a model of brain development. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 150: 1-106.
- **Larson, J., Hoffman, J.S., Guidotti, A., Costa, E.** (2003). Olfactory discrimination learning deficit in heterozygous *reeler* mice. *Brain Research* 971, 40-46.
- **Law, A.J., Weickert, C.S., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Harrsion, P.J.** (2004). Reduced spinophilin but not microtubule-associated protein 2 expression in the hippocampal formation in schizophrenia and mood disorders. *American Journal of Psychiatry* 161, 1848-1855.

- **Levinson, D.F.** (2006). The genetics of depression: a review. *Biological Psychiatry* 60, 84-92.
- **Liguz-Leczna, M., Skangiel-Kramska, J.** (2007). Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 67, 207-218.
- **Liu, S.W., Pesold, C., Rodriguez, M.A., Carboni, G., Auta, J., Laor, P., Larson, J., Condie, B.G., Guidotti, A., Costa, E.** (2001). Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous *reeler* mouse. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 98, 3477-3482.
- **López-Figueroa, Itoi, K., Watson, S.J.** (1998). Regulation of nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat hippocampus by glucocorticoids. *Neuroscience* 87, 439-446.
- **Lourenço Joca, S.R., Guimarães, S.F.** (2006). Inhibition of neuronal nitric oxide in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology* 185, 298-305.
- **Lussier, A.L., Caruncho, H.J., Kalynchuk, L.E.** (2009). Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of reelin-positive cells in the adult rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 460, 170-174.

- **Lynch, M.A.** (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiology Reviews* 84, 87-136.
- **Malenka, R.C., Bear M.F.** (2004). LTP and LTD: An Embarrassment of Riches. *Neuron* 44, 5-21.
- **Malenka, R.C., Siegelbaum, S.A.** (2001) Synaptic plasticity. Diverse targets and mechanisms for regulation synaptic efficacy. *Synapses*. (Eds Cowan, W.M. Südhof, T.C.; Stevens, C.F.) JHU Press, pp: 393-453.
- **Marks, W., Fournier, N.M., Kalynchuk, L.E.** (2009). Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength. *Physiology & Behavior* 98, 67-72.
- **Mataderrona, E.R., Murillo-Carretero, M., Moreno-López, B., Estrada, C.** (2005). Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Research Reviews* 49, 355-366.
- **Matsuzaki, M.** (2007). Factors critical for the plasticity of dendritic spines and memory storage. *Neuroscience Research* 57, 1-9.
- **Maynard, T.M., Sikich, L., Lieberman, J.A., LaMantia A-S.** (2001). Neural development, cell-cell signaling, and the “Two-Hit” Hypothesis of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 27, 457.476.

- **McDonald, C., Marshall, N., Sham, P.C., Bullmore, E.T., Schulze, K., Chapple, B., Bramon, E., Filbey, F., Quraishi, S., Walshe, M., Murray, R.M.** (2006). Regional brain morphometry in patients with schizophrenia or bipolar disorder and their unaffected relatives. *American Journal of Psychiatry* 163, 478-487.
- **McEwen, B.S.** (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annual Review of Neuroscience* 22, 105-1225.
- **McLeod, T.M., López-Figueroa, A.L., López-Figueroa, M.O.** (2006). Nitric Oxide, stress, and depression. *Psychopharmacology* 35, 24-41.
- **Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M.O., Anisman, H.** (2004). Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotrophin-releasing hormone receptors and GABAA receptor subunits in frontal cortical brain region. *Neurobiology of Disease* 11, 1478-1485.
- **Ming G-Li, Song, H.** (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience* 28, 223-250.
- **Minutolo, G., Petralia, A., Dipasquale, S., Aguglia, E.** (2012). Nitric oxide in patients with schizophrenia: the relationship with the severity of illness and the antipsychotic treatment. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 28, (doi: 10.1517/14656566.2012.713346).
- **Nanitsos, E.K., Nguyen, K.T.D., Št'astný, F., Balcar, V.J.** (2005). Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: involvement of Na⁺/K⁺-

- dependent glutamate transport. *Journal of Biomedical Science* 12, 975-984.
- **Nestler, E., Hyman, S.E.** (2010) Animal model of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience* 13, 1161-1169.
 - **Niu, S., Renfro, A., Quattocchi, C.C., Sheldon, M., D'Arcangelo, G.** (2004). Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDL/ApoER2-DAB1 pathway. *Neuron* 41, 71-84.
 - **Nullmeier, S., Panther, P., Dobrowolny, H., Frostcher, M., Zhao, S., Schwegler, H., Wolf, R.** (2010). Region-specific alteration of GABAergic markers in the brain of heterozygous *reeler* mice. *European Journal of Neuroscience* 33, 689-698.
 - **Oliveira, R.M.W., Guimarães, F.S., Deakin, J.F.W.** (2008). Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41, 333-341.
 - **Orlando, G.F., Wolf, G., Engelmann, M.** (2008). Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice. *Amino Acids* 35, 17-27.
 - **Otal Agudo, R.** (2003). Papel de las neurotrofinas y efrinas en el desarrollo y maduración de las conexiones hipocámpicas en ratón. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

- **Packer, M.A., Stasiv, Y., Benraiss, A., Chmielnicki, E., Grinberg, A., Westphal, H., Goldman, S.A., Enikolopov, G.** (2003). Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100, 9566-9571.
- **Page, M.E., Detke, M.J., Dalvi, A., Kirby, L.G., Lucki, I.** (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but no desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology* 147, 162-167.
- **Paizanis, E., Kelaï, S., Renoir, T.** (2007). Life-long hippocampal neurogenesis: environmental, pharmacological and neurochemical modulations. *Neurochemistry Research* 32, 1762-1771.
- **Pappas, D.G., Kriho, V., Pesold, C.** (2001). Reelin in the extracellular matrix and dendritic spines of the cortex and hippocampus: a comparison between wild type and heterozygous *reeler* mice by immunoelectron microscopy. *Journal of Neurocytology* 30, 413-425.
- **Parker, K.J., Schatzberg, A.F., Lyons, D.M.** (2003). Neuroendocrine aspects of hypercostisolism in major depression. *Hormones and Behavior* 43, 60-66.
- **Pesold, C., Imaginatiello, F., Pisu, M.G., Uzunov, D.P., Costa, E., Guidotti, A., Caruncho, H.J.** (1998). Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing γ -aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 3221-3226.

- **Pesold, C., Liu, W.S., Guidotti, A., Costa. E., Caruncho, H.J.** (1999). Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 3217-3222.
- **Pham, K., Nacher, J., Hof, P.R., McEwen, B.S.** (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience* 17, 879-886.
- **Plumpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Romer, B., Rodriguez, G.R., Kronenberg, G., Kempermann, G.** (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neuroscience*.7, 77.
- **Podhorna, J., Didriksen, M.** (2004).The heterozygous reeler mouse: behavioural phenotype. *Behavioural Brain Research* 153, 43-54.
- **Popoli, M., Gennarelli, M., Racagni, G.** (2002). Modulation of Synaptic Plasticity by Stress and Antidepressants. *Bipolar Disorders* 4, 166-182.
- **Porsolt, R.D., Le, P.M., Jalfre, M.** (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.

- **Pothion, S., Bizot, J-C, Trovero F., Belzung, C.** (2004). Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behavioural Brain Research* 155, 135-146.
- **Pujadas, L., Gruart, A., Bosch, C., Delgado, L., Teixeira, M.C., Rossi, D., de Lecea, L., Martínez, A., Delgado-García, J.M., Soriano, E.** (2010). Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 31, 4636-4649.
- **Qiu, S., Korwek, K.M., Pratt-Davis, A.R., Peters, M., Bergman, M.Y., Weeber, E.J.** (2006b). Cognitive disruption and altered hippocampus synaptic function in reelin haploinsufficient mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 85, 228-242.
- **Qiu, S., Korwerk, K.M., Weeber, E.J.** (2006a). A fresh look at an ancient receptor family: emerging roles for low density lipoprotein receptors in synaptic plasticity and memory formation. *Neurobiology of learning and memory* 85, 16-29.
- **Qiu, S., Weeber, E.J.** (2007). Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *Neurophysiology* 97, 2312-2321.
- **Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Streobel, A., Lauer, M., Schmitt, A., Lesch, K.P.** (2006). Neural stem cell proliferation is decreases in schizophrenia but not in depression. *Molecular Psychiatry* 11, 514-522.

- **Reynolds, G.P., Harte, M.K.** (2007). The neuronal pathology of schizophrenia: molecules and mechanisms. *Biochemistry Society Transactions* 35, 433-436.
- **Rice, D.S., Curran, T.** (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annual Review of Neuroscience* 24, 1005-1039.
- **Riedel, W.** (2000). Role of nitric oxide in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Zeitschrift für Rheumatologie* 59, 36-42.
- **Rivera-Baltanás, T., Romay-Tallón, R., Dopeso-Reyes, I.G., Caruncho, H.J.** (2010) Serotonin transporter clustering in blood lymphocytes of reeler mice. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology* 2010, 1-7.
- **Rodríguez, M.A., Pesold, C., Liu, W.S., Kriho, V., Guidotti, A., Pappas, G.D., Costa, E.** (2000). Colocalization of integrin receptors and reelin in dendritic spine postsynaptic densities of adult nonhuman primate cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 13, 3477-3482.
- **Salinger, W.L., Ladrow, P., Wheeler, C.** (2003). Behavioral phenotype of the reeler mutant mouse: effects of *Reln* gene dosage and social isolation. *Behavioral Neuroscience* 117, 1257-1275.
- **Samuels, B.A., Hen, R.** (2011). Neurogenesis and affective disorders. *European Journal of Neuroscience* 33, 1152-10159.

- **Santacana, M., Uttenthal, L.O., Bentura, M.L., Fernández, A.P., Serrano, J., Martínez de Velasco, J., Alonso D., Martínez-Murillo, R., Rodrigo, J.** (1998). Expression of neuronal nitric oxide synthase during embryonic development of the rat cerebral cortex. *Brain Research. Developmental Brain Research* 111, 205-222.
- **Schoenfeld, T.J., Gould, E.** (2012). Stress, Stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental Neurology* 233, 12-21.
- **Seal, R.P., Edwards, R.H.** (2006). The diverse roles of vesicular glutamate transporter 3. *HEP* 175, 137-150.
- **Sen, S., Duman, R., Sanacora, G.** (2008). Serum BDNF, depression and anti-depressant medications: meta-analysis and implications. *Biological Psychiatry* 15, 527-532.
- **Sheriff, F., Orelund, L.** (1995). Effect of the GABA-transaminase inhibitor vigabatrin on exploratory behavior in socially isolated rats. *Behavioural Brain Research* 72, 135-140.
- **Shirayama, Y., Chen, A.C-H, Nakagawa, S., Russell, D.S., Duman, R.S.** (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *Journal of Neuroscience* 22, 3251-3261.
- **Somogyi, J., Baude, A., Omori, Y., Shimizu, H., Mestikawy, S.E., Fukaya, M., Shigemoto, R., Watanabe, M., Somogyi, P.** (2004). GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular

- glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of rat. *European Journal of Neuroscience* 19, 552-569.
- **Squire, L.R., Kandel, E.R.** (1999). A Synaptic Storage Mechanism for Declarative Memory. "Memory. From Mind to Molecules". (ed. Scientific American Library). pp: 109-127.
 - **Steinert, J.R., Chernova, T., Forsythe, I.D.** (2010). Nitric Oxide Signaling in Brain Function, Dysfunction, and Dementia. *The Neuroscientist* 16, 435-452.
 - **Sterner, E.Y., Kalynchuk, L.E.** (2010). Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 34, 777-790.
 - **Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, A.F., Gass, P.** (2004). Stress-induced anhedonia in mice is associated with in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 29, 2007-2017.
 - **Strekalova, T., Steinbusch H.W.M.** (2010). Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry* 34, 346-361.

- **Suzuki, E., Yagi, G., Nakaki, T., Kanba, S., Asai, M.** (2001). Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *Journal of Affective Disorders* 63, 221-224.
- **Szabadits, E., Cserép, C., Szönyi, A., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., Watanabe, M., Itohara, S., Freund, T.F., Nyiri, G.** (2011). NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling. *Journal of Neuroscience* 31, 5893-5904.
- **Tao-Cheng, J.H.** (2006). Activity- related redistribution of presynaptic proteins at the active zone. *Neuroscience* 141, 1217-1224.
- **Taqatqeh, F., Mergia, E., Neitz, A., Eysel, U.T., Koesling, D., Mittmann, T.** (2009). More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 29, 9344-9350.
- **Teixeira, C.M., D Martín, E., Sahún, I., Masachs, N., Pujadas L., Corvelo, A., Bosch, C., Rossi, D., Martínez, A., Maldonado, R., Dierssen, M., Soriano, E.** (2011). Overexpression of reelin prevents the manifestation of behavioral phenotypes related to schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 36, 2395-2405.
- **Tissir, F., Goffinet, A.M.** (2003). Reelin and brain development. *Nature reviews in Neuroscience* 4, 496-505.
- **Torrey, E.F., Barci, M B., Webster, M.J., Bartko, J.J., Meador-Woodruff, J.H., Knable, M.B.** (2005). Neurochemical markers for

- schizophrenia, bipolar disorder and major depression in postmortem brains. *Biological Psychiatry*, 57, 252-260.
- **Tremolizzo, L., Carboni, G., Ruzicka, E.B., Mitchell, C.P., Sugaya, I., Tueting, P., Shama, R., Grayson, D.R., Grayson, D.R., Costa, E., Guidotti, A.** (2002). An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 17095-17100.
 - **Tse, C.Y., Bagot, R.C., Hutter, J.A., Wong, A.S., Wong, T.P.** (2011). Modulation of synaptic plasticity by stress hormone associates with plastic alteration of synaptic NMDA receptor in the adult hippocampus. *PlosOne* 6, 1-14.
 - **Tueting, P., Costa, E., Dwivedi, Y., Guidotti, A., Impagnatiello, F., Manev, R., Pesold, C.** (1999). The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse. *Neuroreport* 26, 1329-1334.
 - **Tueting, P., Doueiri, M-S., Guidotti, A., Davis, J.M., Costa, E.** (2006). Reelin down-regulation in mice and psychosis endophenotypes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 30, 1065-1077.
 - **Uezato A, Meador-Woodruff, J.H., McCullumsmith, R.E.** (2009). Vesicular glutamate transporter mRNA expression in the medial temporal lobe in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Bipolar Disorders* 11, 711-725.

- **Van Groen, T.** (2001). Entorhinal cortex of the mouse: cytoarchitectonical organization. *Hippocampus* 11, 397-407.
- **Vanhatalo, S., Soinila, S.** (1995). Nitric Oxide synthase in the hypothalamo-pituitary pathways. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 8, 165-173.
- **Vawter, M.P., Howard, A.L., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Freed, W.J.** (1999). Alterations of hippocampal secreted N-CAM in bipolar disorder and synaptophysin in schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 4, 467-475.
- **Vawter, M.P., Thatcher, L., Usen, N., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Freed, W.J.** (2002). Reduction of synaptic synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 7, 571-578.
- **Veldic, M., Caruncho, H.J., Liu, W.S., Davis, J., Satta, R., Grayson, D.R., Guidotti, A., Costa, E.** (2004). DNA-Methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 6, 348-353.
- **Ventruiti, A., Kazdoba, M.T., Niu, S., D'Arcangelo, G.** (2011). Reelin deficiency causes specific defects in the molecular composition of the synapses in the adult brain. *Neuroscience* 25; 32-42
- **Vollmayr, B., Simonis, C., Weber, S., Gass, P., Henn, F.** (2003). Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with

- the development of learned helplessness. *Biological Psychiatry* 15, 1035-1040.
- **Von Bohlen, O., Halbach.** (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Research* 329, 409-420.
 - **Warner-Schmidt, J.L., Duman, R.S.** (2006). Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16, 239-249.
 - **Webster, M.J., Weicketer, C.S., Herman, M.M., Hyde, T.M., Kleinman, J.E.** (2001). Synaptophysin and GAP-43 mRNA levels in the hippocampus subjects with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 49, 89-98.
 - **Weeber, E.J., Beffert, U., Jones, C., Christina, J.M., Forster, E., Sweatt, J.D., Herz, J.** (2002). Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *Journal of Biological Chemistry* 277, 39944-39952.
 - **Wegener, G., Volke, V.** (2010). Nitric oxide synthase inhibitors as antidepressants. *Pharmaceuticals* 3, 273-299.
 - **Wegener, G., Volke, V., Rosenger, R.** (2000). Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine *in vivo*. *British Journal of Pharmacology* 130, 575-580.

- **Witter, M.P., Amaral, D.G.** (2004). Hippocampal formation. The Rat Nervous System. G. Paxinos (ed. Elsevier Academic Press, San Diego), *Capítulo 3*, pp: 637-703.
- **Won, S. J., Kim, H.S., Wang, Y., Mao, O.X., Jin, K., Greenberg, D.A.** (2006). Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size. *Experimental Neurology* 198, 250-259.
- **Wong, E.Y.H., Herbert, J.** (2004). The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 20, 2491-2498.
- **Wong, E.Y.H., Herbert, J.** (2006). Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* 137, 83-92.
- **Wong, M.-L., Kling, M.A., Munson, P.J., Listwak, S., Licinio, J., Prolo, P., Karp, B., McCutcheon, I.E., Geraciotti Jr, T.D., DeBellis, M.D., Rice, K.C., Goldstein, D.S., Veldhuis, J.D., Chrousos, G.P., Oldfield, E.H., McCann, S.M., Gold, P.W.** (2000). Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: Relation to hypercortisolism and corticotrophin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 325-330.
- **Xiao, L., Feng, C., Chen, Y.** (2010). Glucocorticoid rapidly enhances NMDA-evoked neurotoxicity by attenuating the NR2A-containing

- NMDA receptor-mediated ERK1/2 activation. *Molecular Endocrinology* 24, 497-510.
- **Yabut, O., Renfro, A., Niu, S., Swann, J.W., Marín, O., D’Arcangelo, G.** (2007). Abnormal laminar position and dendrite development of interneurons in the reeler forebrain. *Molecular Brain Research* 1140, 75-83.
 - **Yazir, Y., Utkan, T., Aricioglu F.** (2012). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase prevents depression-like behaviour in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 111, 154-160.
 - **Yildiz, F., Erden, B.F., Ulak, G., Utkan, T., Gacar, N.** (2000). Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology* 149, 41-44.
 - **Zhang, J., Huang, X-Y., Ye, M-L., Luo, C-X., Wu, H-Y., Hu, Y., Zhou, Q-G., Wu, D-L., Zhu, L-J., Zhu, D-Y.** (2010). Neuronal nitric oxide synthase alteration account for the role of 5-HT_{1A} receptor in modulating anxiety-related behaviors. *Journal of Neuroscience* 30, 2433-2441.
 - **Zhao, Ch., Deng, W., Gage, F.H.** (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.
 - **Zhao, Y., Ma, R., Shen, J., Su, H., Xing, D., Du, L.** (2008a). A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *European Journal of Pharmacology* 581, 113-120.

- **Zhao, Y., Xie, W., Dai, J., Wang, Z., Huang, Y.** (2009). The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice. *Brain Research* 1261, 82-90.
- **Zhao, Z., Wang, W., Guo, H., Zhou, D.** (2008b). Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats. *Behavioral Brain Research* 194, 108-113.
- **Zhou, L., Zhu, D.-Y.** (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation and clinical implications. *Nitric Oxide* 20, 223-230.
- **Zhou, Q-G., Hu, Y., Hua, Y., Hu, M., Luo, C-X., Han, X., Zhu, X-J., Wang, B., Xu, J-S., Zhu, D.Y.** (2007). Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *Journal of Neurochemistry* 103, 1843-1854.
- **Zhou, Q-G., Zhu, L-J., Chen, C., Wu, H-Y., Luo, C-X., Chang, L., Zhu, D.Y.** (2011). Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulation glucocorticoid receptor. *Journal of Neuroscience* 31, 7579-7590.

Research Article

The Coexpression of Reelin and Neuronal Nitric Oxide Synthase in a Subpopulation of Dentate Gyrus Neurons Is Downregulated in Heterozygous Reeler Mice

Raquel Romay-Tallón,¹ Iria G. Dopeso-Reyes,¹ April L. Lussier,²
Lisa E. Kalynchuk,² and Hector J. Caruncho¹

¹Biofarma Research Group, Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 15782 Galicia, Spain

²Neural Systems and Plasticity Research Group, Department of Psychology, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada S7N 5E5

Correspondence should be addressed to Hector J. Caruncho, hectorjuan.caruncho@usc.es

Received 4 May 2010; Revised 4 August 2010; Accepted 11 August 2010

Academic Editor: Anna Braun

Copyright © 2010 Raquel Romay-Tallón et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Reelin is an extracellular matrix protein expressed in several interneuron subtypes in the hippocampus and dentate gyrus. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is also expressed by interneurons in these areas. We investigated whether reelin and nNOS are colocalized in the same population of hippocampal interneurons, and whether this colocalization is altered in the heterozygous reeler mouse. We found colocalization of nNOS in reelin-positive cells in the CA1 stratum radiatum and lacunosum moleculare, the CA3 stratum radiatum, and the dentate gyrus subgranular zone, molecular layer, and hilus. In heterozygous reeler mice, the colocalization of nNOS in reelin-positive cells was significantly decreased only in the subgranular zone and molecular layer. The coexpression of reelin and nNOS in several hippocampal regions suggests that reelin and nNOS may work synergistically to promote glutamatergic function, and the loss of this coexpression in heterozygous reeler mice may underlie some of the behavioral deficits observed in these animals.

1. Introduction

Reelin is a large extracellular matrix protein that plays an important role in regulating neural migration and synaptogenesis during development. It is also a key component of synaptic plasticity in the adult brain (see [1, 2], as recent reviews). As such, reelin promotes dendritic development [3–5] and synaptogenesis [6, 7], contributes to the maturation of dendritic spines [8, 9], increases NMDA receptor subunit activity [10, 11], and enhances long-term potentiation [12–14]. Reelin influences neural plasticity primarily through activation of VLDLR and ApoER2 receptors (for a review, see [2]), but it also increases translation of selective mRNAs in dendritic spines by binding to integrins located in the plasma membrane. One example of this is the recent observation that reelin can increase the translation of activity-related cytoskeletal protein (Arc)

thereby influencing spine maturation and stability [9]. In addition, reelin also induces the clustering of its receptor [15], and increases the number of intramembrane particles (i.e., transmembrane proteins) in synaptosomal membranes [16].

One purpose of the present study was to determine whether nitric oxide is expressed in reelin-positive cells located in the hippocampus and dentate gyrus. Nitric oxide (NO) is a gaseous messenger that plays an important regulatory role in many of the same forms of hippocampal plasticity as those described above for reelin. For example, NO regulates NMDA receptor activity, enhances long-term potentiation, and increases the formation of dendritic spines in the adult brain (see [17]). NO expression in neurons arises from the activity of neuronal nitric oxide synthase (nNOS). These nNOS-positive neurons can be localized via immunohistochemical detection of nicotinamide adenine

dinucleotide phosphate diaphorase (NADPHd), which acts as a coenzyme for nNOS (reviewed in [17]). Given that both reelin and nNOS have been implicated in NMDA receptor regulation and long-term potentiation within hippocampal circuits, we hypothesized that nNOS may be expressed by reelin-positive interneurons in specific hippocampal regions, thus facilitating hippocampal plasticity.

A second purpose of this work was to determine whether the loss of reelin signalling also impacts nNOS expression in the same cells. Deficits in reelin levels and a loss of reelin-positive cells are apparent in brain pathologies such as schizophrenia, depression, and epilepsy and this may be accompanied by alterations in the nitrinergic system. For example, examination of postmortem tissue from patients with schizophrenia revealed a 50% decrease in reelin levels [18–23], a decrease dendritic spine density [24–30], and a decrease in the number of NADPHd- or NOS-positive neurons [31–35]. Importantly, reelin haploinsufficient heterozygous reeler mice (HRM), which express about 50% of normal brain levels of reelin, also show deficits in cortical dendritic spines and GAD67 expression, a decrease of NADPHd-positive neurons in the cortical white matter [36–39], and profound disturbances in hippocampal synaptic plasticity and long-term potentiation [12, 40, 41]. In addition to schizophrenia, reelin deficiencies have been observed in a stress-based animal model of depression [42] and the activity of the nitrinergic system appears to be important for the development of stress and depression symptoms [43]. Finally, a deficiency in hippocampal reelin expression may also be involved in the dysregulation of hippocampal neurobiology underlying the formation of seizures [44–46]. NO and nNOS have been implicated in the initiation of hippocampal seizures [47].

The potential synergistic action of reelin and nNOS in the adult hippocampus has not been studied, but in the olfactory bulb, nNOS-positive neurons express the reelin receptor ApoER2 and target some reelin-positive cells. Surprisingly, there is no neuronal colocalization of both reelin and nNOS in this region in adults [48]. However, during brain development, Cajal-Retzius cells that characteristically express reelin also express nNOS in both rodents [49, 50] and humans [51]. In addition, nitric oxide is expressed by some pyramidal-basket neurons in the dentate subgranular cell layer [52], and we have previously shown that a single layer of pyramidal-basket cells in this region also express reelin [53].

Based on the overall pattern of findings discussed here, we hypothesized that there may be a functional connection between reelin and nNOS in regulating dendritic spine plasticity in hippocampal brain regions, and that this connection may be dysregulated under pathological conditions that affect the hippocampus. To begin to study this hypothesis, we examined the colocalization of reelin and nNOS throughout the hippocampus and dentate gyrus, where both reelin and nNOS appear to be expressed by selective subtypes of GABAergic interneurons [52–57]. We also assessed whether the colocalization of reelin and nNOS-positive neurons under normal circumstances is altered in the heterozygous reeler mouse.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Tissue Processing. We used 16 adult male mice in this experiment: 8 wild type mice (WTM) and 8 heterozygous reeler mice (HRM) (B6C3Fe-a/a-ReI^{nl}). The animals were obtained from heterozygous reeler pairs (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) maintained in our colony at the University of Santiago de Compostela, Spain. Genotyping was performed using the polymerase chain reaction (PCR) technique as described previously [58]. The following primers were used: 5'-TAA TCT GTC CTC ACT CTG CC-3', 3'-ACA GTT GAC ATA CCT TAA TC-5', 3'-TGC ATT AAT GTG CAG TGT TGT 5'. The PCR products were analyzed in a 2% agarose gel. The product from wild type mice DNA is 266 bp long and the product from heterozygous reeler mice is 363 bp long.

For histological studies, the animals were anesthetized with 15% chloral hydrate, followed by transcardial perfusion with saline and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) at room temperature. The brains were removed from the cranium and postfixed for 24 hours at 4°C in the same fixative. Subsequently, the brains were rinsed with 0.1 M PB and cryoprotected with 30% sucrose in 0.1 M PB. The brains were sectioned at 35 µm in a cryostat at -20°C, and the sections were stored in antifreeze solution containing ethylene glycol/glycerol in 0.1 M PB, until immunolabelling.

2.2. Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed on free-floating coronal sections corresponding to the coordinates -1.46 mm to -2.06 mm from bregma [59]. The sections were rinsed several times in Tris buffered saline (pH 7.4, TBS), followed by an overnight incubation at room temperature with mouse monoclonal anti-reelin (1:150, Chemicon, #MAB5364) and rabbit polyclonal anti-nNOS (1:250, Sigma, #N7280) antibodies diluted in a solution containing 15% normal goat serum (NGS), 0.5% Triton X-100, and 1% BSA diluted in TBS. Thereafter, the sections were rinsed with TBS and incubated for 2 hours at room temperature with fluorescent-labelled secondary antibodies: Alexa 488 goat antimouse and Alexa 546 goat anti-abbit. The secondary antibodies were diluted in a solution containing 15% NGS, 0.5% Triton X-100, and 1% BSA in TBS. To assess nonspecific background labelling, we carried out control experiments with the omission of primary antibodies from the incubation cocktail and this resulted in a total absence of labelling.

2.3. Data Analyses and Statistics. Confocal images were obtained using a spectral confocal microscope (Leica TCS SP2) in 1 µm thick virtual slices. The analysis of double-labelled neurons in virtual slices of 1 µm thickness allowed us to identify double-labelled cells more accurately compared to the more standard practice of counting cells in whole sections of 35 µm thickness. This decreased the probability of counting artifacts due to false positives.

Colocalization of reelin-positive and nNOS-positive cells was assessed in the following layers in the hippocampus: stratum oriens (SOs), stratum radiatum (SR), stratum lacunosum moleculare (SLM), and pyramidal cell layer (SP) within

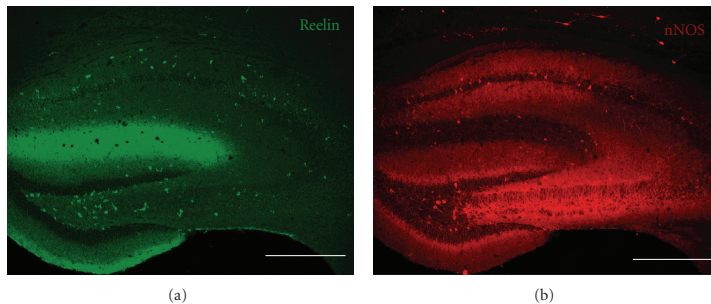


FIGURE 1: Coronal section of the anterior hippocampus immunostained for reelin (a) and nNOS (b). Note that both markers are primarily expressed by some interneuron subtypes in different hippocampal layers, but not by pyramidal neurons or granule cells. Calibration bars: 300 μ m.

the CA1 and CA3 subfields; as well as in the dentate gyrus molecular layer (ML), subgranular zone (SGZ), and the hilus. Within the confocal images, we counted cells that expressed both reelin and nNOS. For each animal, we counted cells in three sections per brain and three random cell fields per layer, using a 40X objective lens. Data are expressed as the mean \pm SEM of the percentage of reelin-positive cells that coexpress nNOS.

For the statistical analyses, we used SPSS software, version 11 (Chicago, IL, USA). Group differences in the percentage of cells showing reelin and nNOS colocalization were examined using separate two-tailed t-tests for each region of the hippocampus. The criterion for statistical significance was set at $P < .05$.

3. Results

Figure 1 shows the overall pattern of reelin (Figure 1(a)) and nNOS (Figure 1(b)) immunoreactivity in the hippocampus of wildtype mice. Reelin immunoreactivity (reln-ir) was located across a subset of nonpyramidal neurons in the hippocampus and dentate gyrus. Reln-ir was primarily seen as cytoplasmic labelling limited to cell bodies and proximal processes. In addition, there was diffuse labelling in the hippocampus stratum lacunosum-moleculare, which probably represents reelin within the neuropil and extracellular space. nNOS immunoreactivity (nNOS-ir) was also observed in scattered nonpyramidal neurons in the hippocampus and dentate gyrus. This labelling was also cytoplasmic and somewhat weaker than what is typically seen in nNOS-ir cortical neurons (see Figure 1(b)).

Figure 2(a) shows an overlay of optical confocal images of both reln-ir and nNOS-ir across the whole hippocampus and several hippocampal subregions in the wildtype mice. The percentage of cells that expressed both reln-ir and nNOS-ir varied across the different hippocampal regions and layers that were quantified. High levels of colocalization between reln-ir and nNOS-ir were seen in the dentate gyrus. Note that the granule cell layer has no reelin-positive cells, so there was no possibility of co-localized expression of reelin

and nNOS in this area. However, in the subgranular zone, about 25% of reln-ir cells expressed nNOS-ir (24.19 ± 2.92); in the hilus, about 20% of reln-ir cells expressed nNOS-ir ($17.39 \pm 3.90\%$); in the molecular layer, about 50% of reln-ir cells expressed nNOS-ir (49.28 ± 2.38). These data are shown in Figure 5.

Within the hippocampus proper, we observed about 20% colocalization of reln-ir and nNOS-ir in the CA1 stratum radiatum (19.35 ± 2.43) and CA1 stratum lacunosum-moleculare (20.44 ± 1.72), and about 10% colocalization of reln-ir and nNOS-ir in the CA3 stratum radiatum (12.58 ± 1.96). There was no colocalization of reln-ir and nNOS-ir in the CA1 and CA3 pyramidal cell layers or stratum oriens. These data are also shown in Figure 5.

Close examination of the images in Figure 2 revealed that the colocalization of reln-ir and nNOS-ir in the CA1 and CA3 stratum radiatum occurs primarily in small multipolar neurons (Figures 2(b) and 2(f)). Colocalization of both markers was also found in some round or fusiform small neurons in the CA1 stratum lacunosum-moleculare and the dentate gyrus molecular layer (Figures 2(c) and 2(g)), in a subpopulation of pyramidal-basket cells in the dentate gyrus subgranular zone (Figures 2(d) and 2(h)), and in some multipolar neurons in the hilus (Figures 2(e) and 2(i)).

Once we established the existence of some colocalization of reln-ir and nNOS-ir in wildtype mice, we proceeded to study whether the pattern and extent of colocalization is altered in the heterozygous reeler mouse. Figures 3 and 4 show representative examples of reln-ir and nNOS-ir colocalization throughout the dentate gyrus and hippocampus whereas Figure 5 shows the quantitative data of this colocalization. The percentage of reln-ir cells that coexpress nNOS-ir was not significantly altered in any quantified regions of the hippocampus and dentate gyrus except for the molecular layer and subgranular zone (all P 's $< .11$). In the molecular layer and subgranular zone, the heterozygous reeler mice had significantly less colocalization of reln-ir and nNOS-ir (ML: $t(13) = 3.93$, $P < .001$; SGZ: $t(13) = 3.01$, $P < .01$). In practical terms, these differences amounted to about a 40% decrease in the percentage of reln-ir cells that

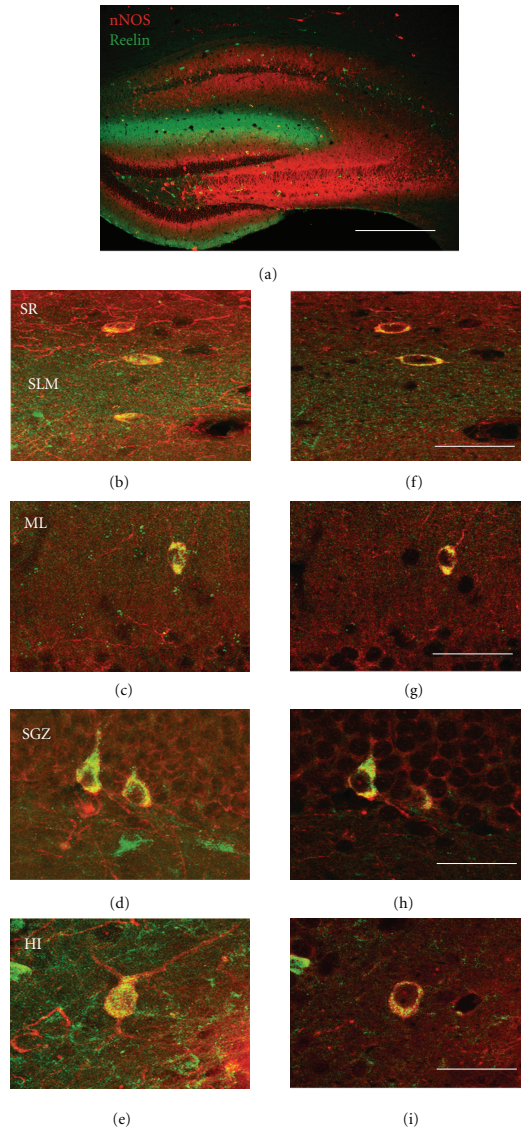


FIGURE 2: Overlay micrograph of double-immunostaining experiments showing colocalization of reelin (green) and nNOS (red) in the anterior hippocampus (a). High magnification micrographs of several hippocampal interneurons coexpressing reelin and nNOS (b–i). The left-side panels show the neurons as seen in $35\ \mu\text{m}$ sections whereas the right-side panels show a virtual section 1mm in thickness of these same neurons. The virtual slices allowed us to confirm the colocalization of both markers in the cytoplasm of the same neurons. SR (stratum radiatum), SLM (stratum lacunosum-moleculare), ML (dentate molecular layer), SGZ (dentate subgranular zone), and HI (hilus). Calibration bars: $300\ \mu\text{m}$ (a), $50\ \mu\text{m}$ (b–i).

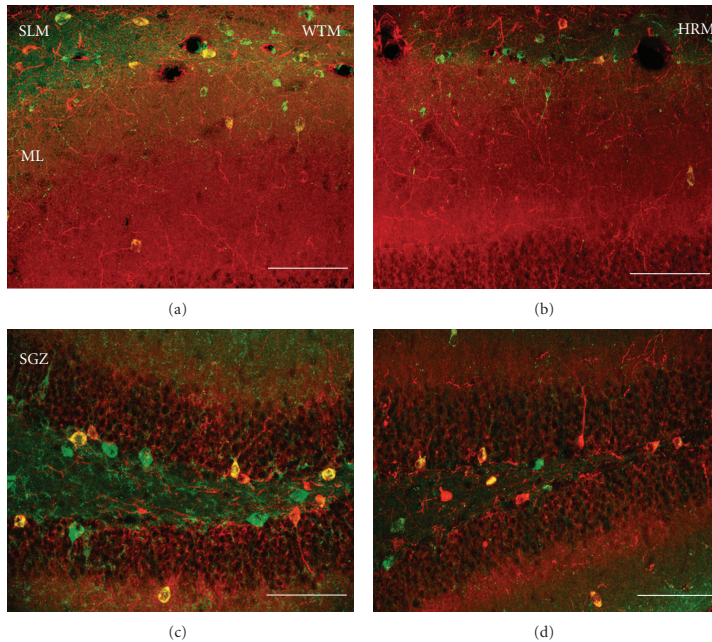


FIGURE 3: Representative micrographs of double immunolabelling of reelin (green) and nNOS (red) in wild type mice (WTM) and heterozygous reeler mice (HRM) in the CA1 stratum lacunosum-moleculare and dentate molecular layer (a, b), and the dentate subgranular zone and hilus (c, d). Note the decrease in the number of neurons coexpressing both markers in the heterozygous reeler mice dentate molecular layer and subgranular zone. Calibration bars: 75 μ m.

coexpress nNOS in the molecular layer of heterozygous mice compared to wildtype mice and about a 45% decrease in the percentage of cells that coexpress nNOS in the subgranular zone of heterozygous mice compared to wildtype mice.

4. Discussion

The results of this study provide the first data showing that a subset of reelin-positive cells throughout the hippocampus and dentate gyrus also express nNOS. They also revealed that this colocalization of reelin and nNOS is substantially decreased in heterozygous reeler mice. Reelin haploinsufficient heterozygous mice generally have reelin levels that are about 50% lower than those observed in wildtype mice [36]. However, despite the lower levels of reelin in these mice, reelin-positive cells can still be detected with immunohistochemistry, albeit with a less intense signal (see Figures 3 and 4). This dictated our approach for measuring the potential colocalization of reelin and nNOS. We opted to assess the percentage of reelin-positive cells that coexpress nNOS, rather than the percentage of nNOS-positive cells that coexpress reelin, because the former method eliminates the possibility of counting artifacts due to very low levels of reelin immunoreactivity. For example, it is possible that nNOS-positive cells might be

considered reelin negative in the heterozygous mice due to very low levels of reelin staining, leading to false negatives.

To our knowledge, there have been no previous studies of reelin and nNOS colocalization in the rodent hippocampus. Previous studies have focused on the olfactory bulb, showing that NOS-positive neurons in this region express receptors for reelin but no reelin itself [48]. Similarly, we have also failed to identify neurons showing both reelin-positive and nNOS-positive in the cerebral cortex (unpublished data). However, the labelling of nNOS-positive in some somatostatin-positive pyramidal-basket cells in the dentate gyrus subgranular layer [52], together with our results indicating that a subset of these cells is reelin-positive [53], prompted us to speculate that perhaps the reelin-positive and nNOS-positive cells were part of the same neuronal subpopulation. In addition, different interneuron GABAergic subtypes in different areas of the rodent hippocampus have been shown to express nNOS [60–63]. Our results demonstrate that we were partially right, in that about 25% of pyramidal-basket reelin-positive cells in the dentate subgranular layer also show nNOS-positive. Interestingly, the colocalization of both markers is not restricted to this cell subpopulation, because we also saw nNOS-positive in about 20% of reelin-positive cells in the stratum radiatum, stratum lacunosum-moleculare, and the hilus, and in about 50% of reelin-positive cells

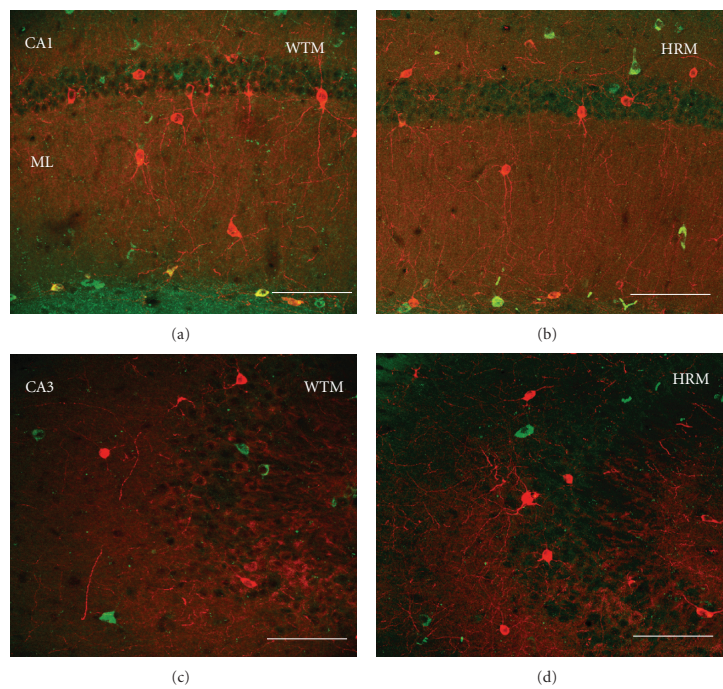


FIGURE 4: Representative micrographs of double immunolabelling of reelin (green) and nNOS (red) in wild type mice (WTM) and heterozygous reeler mice (HRM) in the CA1 (a, b) and CA3 hippocampal regions (c, d). Calibration bars: 75 μ m.

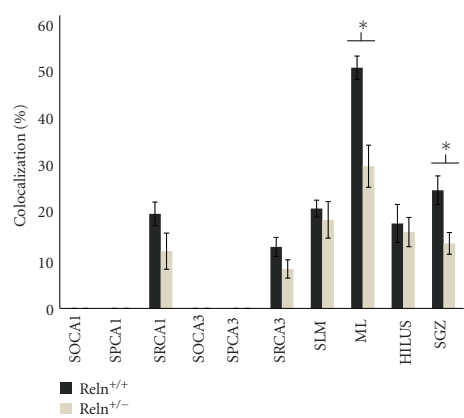


FIGURE 5: Histogram showing the percentage of reelin-ir cells that also show nNOS-ir. Note the decrease in the level of colocalization observed in the dentate molecular layer and subgranular zone of the heterozygous reeler mouse. SO (stratum oriens), SP (pyramidal cell layer), SR (stratum radiatum), SLM (stratum lacunosum-moleculare), ML (dentate molecular layer), and SGZ (dentate subgranular zone). Data are expressed as the mean \pm SEM.

in the dentate distal molecular layer. No colocalization of reelin and nNOS was apparent in the stratum oriens or pyramidal and granule cell layers (although in these last two areas, reelin-ir cells are basically nonexistent). In the adult cortex and hippocampus, reelin is primarily observed on the surface of dendritic spines [8] after being secreted primarily by GABAergic interneuron subtypes impinging onto apical dendrites of pyramidal neurons [55]. Reelin also affects NMDA receptor activity [10, 11] and enhances hippocampal long-term potentiation [12–14]. All these actions are also promoted by nitric oxide (reviewed in [17]). The lack of colocalization of reelin-ir and nNOS-ir in neurons within the stratum oriens that primarily contact basal dendrites of pyramidal neurons, and the partial colocalization of both markers in interneurons of the stratum radiatum, stratum lacunosum-moleculare, and dentate molecular layer, suggest that there could be a synergic action of both reelin and NO in strengthening some glutamatergic synapses onto the distal apical dendrite of pyramidal (or dentate granule cell layer) neurons, potentially facilitating long-term potentiation. Clearly, additional studies will be needed to evaluate this hypothesis.

A second issue is that of the colocalization of reelin and nNOS in a subpopulation of reelin-ir cells in the subgranular zone. These cells are pyramidal-basket cells that impinge onto the cell body of granule neurons. It is possible that the release of reelin and NO in the subgranular zone, or by cells in the hilus, could influence the migration and maturation of newly born granule cells. Lussier et al. [42] recently showed that repeated exposure to high levels of glucocorticoids, which increases depression-like behavior and decreases hippocampal neurogenesis [64–66], significantly decreases the number of reelin-positive cells in the subgranular zone of the dentate gyrus [42]. Similarly, Pujadas et al. [67] reported that reelin overexpression increased hippocampal neurogenesis, increased synaptic contacts, and produced dendritic hypertrophy. These results provide some momentum for the idea that reelin-positive cells in the subgranular zone influence neurogenesis, but whether these reelin-positive cells are the ones that also contain nNOS and how exactly reelin and nNOS interact awaits further study. Preliminary studies from our laboratory have shown that heterozygous reeler mice show alterations in the maturation of newborn dentate granule cells, which could relate to possible disruptions in plasticity within the dentate gyrus. We have also found that heterozygous reeler mice are more vulnerable to the deleterious effects of corticosterone on reelin-positive pyramidal-basket cells and depressive-like behavior (Lussier et al., personal communication).

A final issue relates to the functional implications of a decrease in reelin and nNOS colocalization in heterozygous reeler mice. A previous study by Hermann et al. [68] showed a decline in nNOS protein, but not nNOS mRNA, in the olfactory bulb of reeler mice. Here, we report a decrease of about 40%–45% of reelin-positive cells that coexpress nNOS specifically in the dentate molecular layer and subgranular zone, but not in other hippocampal areas. Although this is not a functional study, it is tempting to propose that the specific alteration of reelin and nNOS colocalization in

the dentate gyrus of heterozygous reeler mice could underlie some of the disturbances in synaptic plasticity that have been observed in these mice [12, 40, 41]. For example, Qiu et al. [40] found that heterozygous reeler mice are impaired on a contextual fear-conditioning task and also display deficits in long-term depression and long-term potentiation. The converse relationship is also true. Pujadas et al. [67] revealed that reelin overexpression provoked substantial increases in long-term potentiation. Importantly, nNOS knockout mice have a severe deficit in contextual fear conditioning [69, 70] and nNOS is required for the induction of long-term potentiation [71]. However, one should consider that most of these studies focus primarily on hippocampal CA1 long-term potentiation whereas our observations show a deficient reelin-nNOS colocalization in the dentate gyrus of the heterozygous reeler mouse. Therefore, it would be interesting to study potential alterations in long-term potentiation in the dentate gyrus of these animals, mostly taking into account that dentate gyrus long-term potentiation enhances adult dentate neurogenesis and the rate of new neuron survival and maturation [72–74], and that the induction of long-term depression suppresses this effect [75]. In any case, the fact that reelin and nNOS seem to be involved in similar types of hippocampal-dependent behavior and synaptic plasticity, combined with our observations here of colocalization of reelin and nNOS throughout the hippocampus and dentate gyrus and loss of colocalization when reelin is deficient, suggest that reelin and nNOS may work together to regulate some aspects of hippocampal function.

In conclusion, the results of this study demonstrate that a subpopulation of hippocampal and dentate gyrus reelin-positive cells also express nNOS, and that this coexpression is decreased selectively in the dentate gyrus of heterozygous reeler mice. We propose that some of these alterations could be operative in the disturbed synaptic plasticity associated with a loss of reelin.

Acknowledgments

This paper was supported by Grant SAF2007-62766 from the Spanish Ministry of Science and Technology and FEDER, XUGA Grant PGIDIT06PXIB200166PR to H. J. Caruncho, and an NSERC grant to L. E. Kalynchuk. L. E. Kalynchuk is a Canada Research Chair in Behavioral Neuroscience.

References

- [1] J. Herz and Y. Chen, "Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 7, no. 11, pp. 850–859, 2006.
- [2] J. T. Rogers and E. J. Weeber, "Reelin and apoE actions on signal transduction, synaptic function and memory formation," *Neuron Glia Biology*, vol. 4, no. 3, pp. 259–270, 2008.
- [3] Y. Jossin and A. M. Goffinet, "Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 27, no. 20, pp. 7113–7124, 2007.

- [4] S. Niu, O. Yabut, and G. D'Arcangelo, "The reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons," *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 41, pp. 10339–10348, 2008.
- [5] H.-S. Hoe, J. L. Kea, R. S. E. Carney et al., "Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth," *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 23, pp. 7459–7473, 2009.
- [6] V. Borrell, J. A. Del Rio, S. Alcantara et al., "Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections," *Journal of Neuroscience*, vol. 19, no. 4, pp. 1345–1358, 1999.
- [7] V. Borrell, L. Pujadas, S. Simó et al., "Reelin and mDab1 regulate the development of hippocampal connections," *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 36, no. 2, pp. 158–173, 2007.
- [8] M. A. Rodriguez, C. Pesold, W. S. Liu et al., "Colocalization of integrin receptors and reelin in dendritic spine postsynaptic densities of adult nonhuman primate cortex," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 7, pp. 3550–3555, 2000.
- [9] E. Dong, H. Caruncho, W. S. Liu et al., "A reelin-integrin receptor interaction regulates Arc mRNA translation in synaptoneurosome," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 9, pp. 5479–5484, 2003.
- [10] Y. Chen, U. Beffert, M. Ertunc et al., "Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons," *Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 36, pp. 8209–8216, 2005.
- [11] C. Gonzalez Campo, M. Sinagra, D. Verrier, O. J. Manzoni, and P. Chavis, "Reelin secreted by GABAergic neurons regulates glutamate receptor homeostasis," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 5, article no. e5505, 2009.
- [12] E. J. Weeber, U. Beffert, C. Jones et al., "Reelin and apoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 42, pp. 39944–39952, 2002.
- [13] U. Beffert, E. J. Weeber, A. Durudas et al., "Modulation of synaptic plasticity and memory by reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2," *Neuron*, vol. 47, no. 4, pp. 567–579, 2005.
- [14] U. Beffert, A. Durudas, E. J. Weeber et al., "Functional dissection of reelin signaling by site-directed disruption of disabled-1 adaptor binding to apolipoprotein E receptor 2: distinct roles in development and synaptic plasticity," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 7, pp. 2041–2052, 2006.
- [15] V. Strasser, D. Fasching, C. Hauser et al., "Receptor clustering is involved in reelin signaling," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 3, pp. 1378–1386, 2004.
- [16] H. J. Caruncho, I. G. Dopeso-Reyes, M. I. Loza, and M. A. Rodriguez, "GABA, reelin, and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia," *Critical Reviews in Neurobiology*, vol. 16, no. 1–2, pp. 25–32, 2004.
- [17] L. Zhou and D.-Y. Zhu, "Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications," *Nitric Oxide*, vol. 20, no. 4, pp. 223–230, 2009.
- [18] F. Impagnatiello, A. R. Guidotti, C. Pesold et al., "A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 26, pp. 15718–15723, 1998.
- [19] A. Guidotti, J. Auta, J. M. Davis et al., "Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study," *Archives of General Psychiatry*, vol. 57, no. 11, pp. 1061–1069, 2000.
- [20] S. H. Fatemi, J. A. Earle, and T. McMenomy, "Reduction in reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression," *Molecular Psychiatry*, vol. 5, no. 6, pp. 654–663, 2000.
- [21] S. H. Fatemi, J. L. Kroll, and J. M. Sary, "Altered levels of reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders," *NeuroReport*, vol. 12, no. 15, pp. 3209–3215, 2001.
- [22] S. L. Eastwood and P. J. Harrison, "Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis," *Molecular Psychiatry*, vol. 8, no. 9, pp. 821–831, 2003.
- [23] S. L. Eastwood and P. J. Harrison, "Cellular basis of reduced cortical reelin expression in schizophrenia," *American Journal of Psychiatry*, vol. 163, no. 3, pp. 540–542, 2006.
- [24] R. C. Roberts, R. Conley, L. Kung, F. J. Peretti, and D. J. Chute, "Reduced striatal spine size in schizophrenia: a postmortem ultrastructural study," *NeuroReport*, vol. 7, no. 6, pp. 1214–1218, 1996.
- [25] L. J. Garey, W. Y. Ong, T. S. Patel et al., "Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia," *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 65, no. 4, pp. 446–453, 1998.
- [26] L. A. Glantz and D. A. Lewis, "Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia," *Archives of General Psychiatry*, vol. 57, no. 1, pp. 65–73, 2000.
- [27] A. J. Law, C. S. Weickert, T. M. Hyde, J. E. Kleinman, and P. J. Harrison, "Reduced spinophilin but not microtubule-associated protein 2 expression in the hippocampal formation in schizophrenia and mood disorders: molecular evidence for a pathology of dendritic spines," *American Journal of Psychiatry*, vol. 161, no. 10, pp. 1848–1855, 2004.
- [28] N. Kolluri, Z. Sun, A. R. Sampson, and D. A. Lewis, "Lamina-specific reductions in dendritic spine density in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia," *American Journal of Psychiatry*, vol. 162, no. 6, pp. 1200–1202, 2005.
- [29] J. J. Hill, T. Hashimoto, and D. A. Lewis, "Molecular mechanisms contributing to dendritic spine alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia," *Molecular Psychiatry*, vol. 11, no. 6, pp. 557–566, 2006.
- [30] R. A. Sweet, R. A. Henteloff, W. Zhang, A. R. Sampson, and D. A. Lewis, "Reduced dendritic spine density in auditory cortex of subjects with schizophrenia," *Neuropsychopharmacology*, vol. 34, no. 2, pp. 374–389, 2009.
- [31] S. Akbarian, W. E. Bunney Jr., S. G. Potkin et al., "Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development," *Archives of General Psychiatry*, vol. 50, no. 3, pp. 169–177, 1993.
- [32] S. Akbarian, A. Viñuela, J. J. Kim, S. G. Potkin, W. E. Bunney Jr., and E. G. Jones, "Distorted distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase neurons in temporal lobe of schizophrenics implies anomalous cortical development," *Archives of General Psychiatry*, vol. 50, no. 3, pp. 178–187, 1993.
- [33] S. Akbarian, J. J. Kim, S. G. Potkin, W. P. Hetrick, W. E. Bunney Jr., and E. G. Jones, "Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients," *Archives of General Psychiatry*, vol. 53, no. 5, pp. 425–436, 1996.

- [34] M. Lauer, S. Johannes, S. Fritzen, D. Senitz, P. Riederer, and A. Reif, "Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients," *Neuropsychobiology*, vol. 52, no. 3, pp. 111–117, 2005.
- [35] S. Fritzen, M. Lauer, A. Schmitt et al., "NO synthase-positive striatal interneurons are decreased in schizophrenia," *European Neuropsychopharmacology*, vol. 17, no. 9, pp. 595–599, 2007.
- [36] P. Tuetting, E. Costa, Y. Dwivedi et al., "The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse," *NeuroReport*, vol. 10, no. 6, pp. 1329–1334, 1999.
- [37] W. S. Liu, C. Pesold, M. A. Rodriguez et al., "Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 6, pp. 3477–3482, 2001.
- [38] G. D. Pappas, V. Kriho, and C. Pesold, "Reelin in the extracellular matrix and dendritic spines of the cortex and hippocampus: a comparison between wild type and heterozygous reeler mice by immunoelectron microscopy," *Journal of Neurocytology*, vol. 30, no. 5, pp. 413–425, 2001.
- [39] G. Carboni, P. Tuetting, L. Tremolizzo et al., "Enhanced dizocilpine efficacy in heterozygous reeler mice relates to GABA turnover downregulation," *Neuropharmacology*, vol. 46, no. 8, pp. 1070–1081, 2004.
- [40] S. Qiu, K. M. Korvek, A. R. Pratt-Davis, M. Peters, M. Y. Bergman, and E. J. Weeber, "Cognitive disruption and altered hippocampus synaptic function in reelin haploinsufficient mice," *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 85, no. 3, pp. 228–242, 2006.
- [41] S. Qiu and E. J. Weeber, "Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses," *Journal of Neurophysiology*, vol. 97, no. 3, pp. 2312–2321, 2007.
- [42] A. L. Lussier, H. J. Caruncho, and L. E. Kalynchuk, "Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of reelin-positive cells in the adult rat hippocampus," *Neuroscience Letters*, vol. 460, no. 2, pp. 170–174, 2009.
- [43] G. F. Orlando, G. Wolf, and M. Engelmann, "Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice," *Amino Acids*, vol. 35, no. 1, pp. 17–27, 2008.
- [44] C. Heinrich, N. Nitta, A. Flubacher et al., "Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 17, pp. 4701–4713, 2006.
- [45] C. Gong, T.-W. Wang, H. S. Huang, and J. M. Parent, "Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus," *Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 8, pp. 1803–1811, 2007.
- [46] N. M. Fournier, D. R. Andersen, J. J. Botterill et al., "The effect of amygdala kindling on hippocampal neurogenesis coincides with decreased reelin and DISC1 expression in the adult dentate gyrus," *Hippocampus*, vol. 20, no. 5, pp. 659–671, 2010.
- [47] R. Kovács, A. Rabanus, J. Otáhal et al., "Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices," *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 26, pp. 8565–8577, 2009.
- [48] G. Herrmann, G. Mishev, and A. L. Scotti, "Olfactory bulb interneurons releasing NO exhibit the reelin receptor ApoEr2 and part of those targeted by NO express reelin," *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 36, no. 3–4, pp. 160–169, 2008.
- [49] D. S. Bredt and S. H. Snyder, "Nitric oxide: a physiological messenger molecule," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 63, pp. 175–195, 1994.
- [50] M. Santacana, L. O. Utenthal, M. L. Bentura et al., "Expression of neuronal nitric oxide synthase during embryonic development of the rat cerebral cortex," *Developmental Brain Research*, vol. 111, no. 2, pp. 205–222, 1998.
- [51] M. Judaš, N. Šestan, and I. Kostović, "Nitrergic neurons in the developing and adult human telencephalon: transient and permanent patterns of expression in comparison to other mammals," *Microscopy Research and Technique*, vol. 45, no. 6, pp. 401–419, 1999.
- [52] N. J. Dun, S. L. Dun, R. K. S. Wong, and U. Forstermann, "Colocalization of nitric oxide synthase and somatostatin immunoreactivity in rat dentate hilar neurons," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 8, pp. 2955–2959, 1994.
- [53] C. Pesold, F. Impagnatiello, M. G. Pisu et al., "Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing γ -aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 6, pp. 3221–3226, 1998.
- [54] S. Alcántara, M. Ruiz, G. D'Arcangelo et al., "Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse," *Journal of Neuroscience*, vol. 18, no. 19, pp. 7779–7799, 1998.
- [55] C. Pesold, W. S. Liu, A. Guidotti, E. Costa, and H. J. Caruncho, "Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 6, pp. 3217–3222, 1999.
- [56] Y. H. Chung, Y. S. Kim, and W. B. Lee, "Distribution of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the cerebral cortex and hippocampus during postnatal development," *Journal of Molecular Histology*, vol. 35, no. 8–9, pp. 765–770, 2004.
- [57] S. Gotti, M. Sica, C. Viglietti-Panzica, and G. Panzica, "Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain," *Microscopy Research and Technique*, vol. 68, no. 1, pp. 13–35, 2005.
- [58] G. D'Arcangelo, G. G. Miao, S.-C. Chen, H. D. Soares, J. I. Morgan, and T. Curran, "A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler," *Nature*, vol. 374, no. 6524, pp. 719–723, 1995.
- [59] G. Paxinos and J. K. B. Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 2nd edition, 2004.
- [60] S. Jinno, Y. Aika, T. Fukuda, and T. Kosaka, "Quantitative analysis of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the mouse hippocampus with optical disector," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 410, no. 3, pp. 398–412, 1999.
- [61] S. Jinno, N. Kinukawa, and T. Kosaka, "Morphometric multivariate analysis of GABAergic neurons containing calretinin and neuronal nitric oxide synthase in the mouse hippocampus," *Brain Research*, vol. 900, no. 2, pp. 195–204, 2001.
- [62] S. Jinno and T. Kosaka, "Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 449, no. 1, pp. 1–25, 2002.

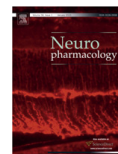
- [63] S. Jinno and T. Kosaka, "Patterns of colocalization of neuronal nitric oxide synthase and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical disector," *Neuroscience*, vol. 124, no. 4, pp. 797–808, 2004.
- [64] L. E. Kalynchuk, A. Gregus, D. Boudreau, and T. S. Perrot-Sinal, "Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats," *Behavioral Neuroscience*, vol. 118, no. 6, pp. 1365–1377, 2004.
- [65] A. Gregus, A. J. Wintink, A. C. Davis, and L. E. Kalynchuk, "Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats," *Behavioural Brain Research*, vol. 156, no. 1, pp. 105–114, 2005.
- [66] S. Brummelte and L. A.M. Galea, "Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats," *Neuroscience*, vol. 168, no. 3, pp. 680–690, 2010.
- [67] L. Pujadas, A. Gruart, C. Bosch et al., "Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 13, pp. 4636–4649, 2010.
- [68] G. Herrmann, R. Hlushchuk, O. Baum, and A. L. Scotti, "Nitric oxide synthase protein levels, not the mRNA, are downregulated in olfactory bulb interneurons of reeler mice," *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 33, no. 2, pp. 87–96, 2007.
- [69] J. B. Kelley, M. A. Balda, K. L. Anderson, and Y. Itzhak, "Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene," *Learning and Memory*, vol. 16, no. 6, pp. 371–378, 2009.
- [70] J. B. Kelley, K. L. Anderson, and Y. Itzhak, "Pharmacological modulators of nitric oxide signaling and contextual fear conditioning in mice," *Psychopharmacology*, vol. 210, no. 1, pp. 65–74, 2010.
- [71] F. Taqatqeh, E. Mergia, A. Neitz, U. T. Eysel, D. Koesling, and T. Mittmann, "More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation," *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 29, pp. 9344–9350, 2009.
- [72] E. Bruel-Jungerman, S. Davis, C. Rampon, and S. Laroche, "Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 22, pp. 5888–5893, 2006.
- [73] S. K. Chun, W. Sun, J.-J. Park, and M. W. Jung, "Enhanced proliferation of progenitor cells following long-term potentiation induction in the rat dentate gyrus," *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 86, no. 3, pp. 322–329, 2006.
- [74] T. Kitamura, Y. Saitoh, A. Murayama, H. Sugiyama, and K. Inokuchi, "LTP induction within a narrow critical period of immature stages enhances the survival of newly generated neurons in the adult rat dentate gyrus," *Molecular Brain*, vol. 3, article no. 13, 2010.
- [75] S. K. Chun, W. Sun, and M. W. Jung, "LTD induction suppresses LTP-induced hippocampal adult neurogenesis," *NeuroReport*, vol. 20, no. 14, pp. 1279–1283, 2009.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Reelin as a putative vulnerability factor for depression: Examining the depressogenic effects of repeated corticosterone in heterozygous reeler mice

April L. Lussier^{a,1}, Raquel Romay-Tallón^{b,1}, Lisa E. Kalynchuk^{a,1}, Hector J. Caruncho^{b,1,*}

^a Neural Systems and Plasticity Research Group, Department of Psychology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada S7V 1C2

^b Department of Cell Biology, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2010

Received in revised form

1 September 2010

Accepted 7 September 2010

Keywords:

Stress

Corticosterone

Depression

Schizophrenia

Reelin

Hippocampus

Neurogenesis

Two-hit hypothesis

Heterozygous reeler mouse

ABSTRACT

We examined a potential two-hit murine animal model of depression by assessing whether a genetic deficit in reelin increases vulnerability to the depressogenic effects of the stress hormone corticosterone. Stress is an identified risk factor for the onset of depressive symptoms, but depression also has a significant genetic component, suggesting that environmental factors and genetic background likely interact in the etiology of depression. Previous results have revealed that reelin levels are decreased in post-mortem hippocampal tissue from patients with schizophrenia, bipolar disorder and depression, and also in an animal model of depression. Therefore, we hypothesized that heterozygous reeler mice (HRM), with approximately 50% normal levels of reelin, would be more sensitive to the depressogenic effects of corticosterone than wild-type mice (WTM). Mice received subcutaneous injections of either vehicle or 5 mg/kg, 10 mg/kg, or 20 mg/kg of corticosterone for 21 consecutive days, and then they were assessed for changes in depression-like behavior, hippocampal reelin expression, and hippocampal neurogenesis. Corticosterone produced dose-dependent increases in depression-like behavior and decreases in reelin expression, neurogenesis, and cell maturation regardless of mouse genotype. There were no differences between the vehicle-injected HRM and WTM in these measures. However, the effects of CORT on behavior, the number of reelin-positive cells in the subgranular zone or hilus, and hippocampal neurogenesis were more pronounced in the HRM than in the WTM, providing support for the idea that mice with impaired reelin signaling may be more vulnerable to the deleterious effects of glucocorticoids.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Depression is a debilitating syndrome characterized by sadness, lack of motivation, anhedonia, helpless behaviors, cognitive deficiencies, and sleep and appetite disturbances. The vast majority of basic research on depression has focused on a putative link between exposure to stressful life events and the onset of depressive symptoms (reviewed in [Sternner and Kalynchuk, 2010](#)). This link is evidenced by a number of correlational observations, including the fact that many patients with depression show hypercortisolemia and disrupted cortisol rhythmicity ([Burke et al., 2005](#); [Belmaker and Agam, 2008](#)), elevated corticotrophin-releasing hormone (CRH) levels in cerebrospinal fluid, and increased levels of

CRH mRNA and protein expression in limbic brain regions ([Merali et al., 2004](#)). Not surprisingly, most animal models of depression make use of repeated stress paradigms to study the neurobiological correlates of depression. However, depression is not caused solely by environmental conditions. The etiology of depression also has a significant genetic component, with heritability estimates ranging from 33% to 50% ([Fava and Kendler, 2000](#); [Levinson, 2006](#)). This suggests that like schizophrenia and bipolar disorder, depression may be best conceptualized using a two-hit hypothesis ([Maynard et al., 2001](#)), where genetic alterations in early development confer a biological vulnerability that can lead to the disorder in individuals who are subsequently exposed to precipitating environmental events. Indeed, depressive symptomatology is not restricted to patients with major depression: Depressive symptoms are a key component of bipolar disorder and they also frequently occur in patients with schizophrenia ([Hafner et al., 2005a, 2005b](#)). The manifestation of depressive symptoms in any one of these disorders could involve an interaction between genetic abnormalities during development and exposure to chronic stress later in life.

* Corresponding author. Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Edificio CIBUS (3.05), Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain. Tel.: +34 981563100x16949; fax: +34 981528006.

E-mail address: hectorjuan.caruncho@usc.es (H.J. Caruncho).

¹ Denotes equal contribution by all authors.

In this experiment, we asked whether a developmental genetic deficit in reelin signaling could make mice more vulnerable to the depressogenic effects of repeated exposure to glucocorticoids in adulthood. Reelin is a large extracellular matrix protein that is active in both the developing and mature brain. In early development, reelin is expressed by cortical and hippocampal Cajal–Retzius cells, olfactory bulb mitral cells, and cerebellar granule cells, where it controls radial neuronal migration and cell layer formation (reviewed in Tissir and Goffinet, 2003). In the adult brain, reelin is secreted by a subset of GABAergic interneurons in the cortex and hippocampus (Alcantara et al., 1998; Pesold et al., 1998, 1999; Abraham and Meyer, 2003), where it plays a prominent role in regulating neural plasticity by enhancing cell migration and integration, facilitating synaptogenesis, and stabilizing synaptic contacts onto dendritic spines (Rodríguez et al., 2000, 2002; Liu et al., 2001; Drakew et al., 2002; Frotscher et al., 2003; Weiss et al., 2003; Zhao et al., 2004, 2006; Forster et al., 2006; Niu et al., 2004, 2008; Herz and Chen, 2006; Gong et al., 2007; MacLaurin et al., 2007; Pujadas et al., 2010).

Given that many of the functional properties of reelin mirror those that are disrupted or impaired in schizophrenia, bipolar disorder, and depression, it is logical to wonder whether reelin might be involved in the pathogenesis of these disorders. This issue was first addressed by the pioneering studies carried out under the direction of Dr. Erminio Costa at the University of Illinois at Chicago, which clearly demonstrated a widespread downregulation of reelin expression levels in post-mortem brain samples from patients with schizophrenia and bipolar disorder (Impagnatiello et al., 1998; Guidotti et al., 2000). These results were subsequently replicated and extended by other researchers (Fatemi et al., 2000, 2001, 2005; Knabe et al., 2004; Eastwood and Harrison, 2006). Of particular importance is the observation by Fatemi et al. (2000) that reelin levels are downregulated in post-mortem hippocampal tissue not just in schizophrenia and bipolar disorder, but also in major depressive disorder (albeit the decrease in depression is more subtle than in schizophrenia and bipolar disorder). Taken together, these findings suggested that a deficit in reelin signaling could be important for the development of several psychiatric disorders, including depression, and that this was an issue that should be investigated in preclinical animal models of these disorders.

To study whether a loss of reelin could be a vulnerability factor for depression, we used a strain of haploinsufficient heterozygous reeler mice (HRM), which typically have about 50% of normal brain levels of reelin. Behaviorally, these mice are not obviously different from wild-type mice (WTM), but they do show subtle deficits in prepulse inhibition and impairments on some measures of cognition and executive function (Tueting et al., 1999; Brigman et al., 2006; Krueger et al., 2006; Qiu et al., 2006; Barr et al., 2008; Ammasari-Teule et al., 2009). To our knowledge, depression-like behavior has not been assessed in these mice. Interestingly, HRM do show neuroanatomical and neurochemical alterations in brain regions that have been implicated in depression (i.e., hippocampus, cortex, prefrontal cortex, see Tueting et al., 2006 for a review), which may make them more vulnerable than WTM to the deleterious effects of stress or glucocorticoids. Therefore, we challenged HRM and WTM mice with repeated exposure to different doses of corticosterone (CORT), and measured changes in depression-like behavior, the number of reelin-positive cells in the dentate gyrus, and hippocampal neurogenesis. We chose to use CORT for this experiment because we have previously shown that repeated daily injections of CORT reliably increase depression-like behavior in a dose-dependent manner in normal rodents (Kalynchuk et al., 2004; Gregus et al., 2005; Johnson et al., 2006; Marks et al., 2009). In a preliminary study, we also found that repeated CORT injections decrease the number of reelin-positive cells selectively in

the CA1 stratum lacunosum-moleculare and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (Lussier et al., 2009). This latter change was particularly thought-provoking, because a lack of reelin within pyramidal-basket cells in the SGZ could have direct effects on hippocampal neurogenesis, and one prominent hypothesis about the neurobiology of depression suggests that a deficit in neurogenesis could play a causal role in depression (e.g., Jacobs, 2002; Kempermann and Kronenberg, 2003; Dranovsky and Hen, 2006; Koo et al., 2010). Importantly, we also found that rats exposed to a repeated restraint stress procedure that does not increase depression-like behavior show no changes in the number of reelin-positive cell anywhere in the hippocampus (Gregus et al., 2005; Lussier et al., 2009). Therefore, exposure to stress or glucocorticoids does not seem to produce a deficit in hippocampal reelin expression unless the stressor also produces a behavioral phenotype of depression.

Based on the findings from post-mortem tissue and animal models described above, our primary hypothesis was that the HRM mice would be more susceptible to the depressogenic effects of repeated CORT than WTM. We expected to see greater increases in depression-like behavior in a dose-dependent manner in the HRM, as well as fewer reelin-positive cells and more deficits in hippocampal neurogenesis and neuronal maturation. The present report evaluates this hypothesis by employing several behavioral and immunohistochemical paradigms.

2. Materials and methods

2.1. Animals

We used 45 male wild-type mice (WTM) and 45 male reelin haploinsufficient heterozygous reeler mice (HRM) in this experiment. HRM and their wild-type littermates were generated from heterozygous (B6C3Fe-a/a-*Reln*^{fl/+}) breeding pairs (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) maintained in our colony at the University of Santiago de Compostela, Spain. The genotype of each mouse was confirmed using standard polymerase chain reaction (PCR) techniques on tail samples as described previously (D'Arcangelo et al., 1995). The following oligonucleotide primers were used: 5'-TAA TCT GTC CTC CTG CC-3', 3'-ACA GTT GAC ATA CCT TAA TC-5', 3'-TGC ATT AAT GTG CAG TGT TGT-5'. The PCR products were analyzed in a 2% agarose gel: The product from wild type mice DNA is 266 bp long and the product from heterozygous reeler mice is 363 bp long. All mice used in this experiment were randomly chosen from a number of litters that were born at about the same time.

The mice were individually housed under standard conditions with food and water available *ad libitum*. They were approximately 3 months of age at the start of experiment and weighed an average of 30.59 g. There was a 12 h:12 h light/dark cycle with the lights turned on at 8:00 am.

2.2. Experimental procedures

All experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care, the University of Saskatchewan Committee on Animal Care, the European Communities Council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), the Spanish royal decree 1201/2005, and the Bioethics Committee of the University of Santiago de Compostela. Both HRM and WTM were randomly assigned to groups that received one of the following four treatments by subcutaneous injections of CORT or vehicle: CORT injections at a dose of 20 mg/kg ($n = 12$ HRM; $n = 12$ WTM), CORT injections at a dose of 10 mg/kg ($n = 11$ HRM; $n = 11$ WTM), CORT injections at a dose of 5 mg/kg ($n = 11$ HRM; $n = 11$ WTM) or vehicle injections ($n = 11$ HRM; $n = 11$ WTM). These doses were chosen on the basis of previous work in our laboratory showing that repeated CORT injections have dose-dependent depressogenic effects in rats (Johnson et al., 2006) and the recent observation that 21 days of 20 mg/kg of CORT injections increase depression-like behavior in the forced swim test in c57 mice (Zhao et al., 2008). We included doses below 20 mg/kg because we hypothesized that the HRM might be more vulnerable to the deleterious effects of CORT and we wanted to include doses that might be below threshold for the WTM but not the HRM. All CORT and vehicle injections were delivered subcutaneously at a volume of 5 ml/kg, between 9:00 and 11:00 am each day, for 21 consecutive days. CORT (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was suspended in .9% physiological saline with 2% polyoxyethylene glycol sorbitan monooleate (Tween-80; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO).

2.3. Behavioral testing

All behavioral testing was conducted in a different room from those used for the injections and housing. Mice were tested between 11 am and 7 pm. All behaviors were videotaped and scored at a later date by a trained observer who was blind to the experimental conditions.

2.3.1. Forced swim test

The forced swim test was conducted on the day after the final injection. Each mouse was placed individually into a 3 L beaker containing $25 \pm 1^\circ\text{C}$ water that was 15 cm deep. The mouse was left in the beaker for 6 min. Immobility, swimming and struggling behaviors were timed (in sec) over the last 4 min of the 6 min trial (Porsolt et al., 1977). Immobility was defined as the absence of head movement or body propulsion (Strekalova et al., 2004; Cryan et al., 2005; Stevenson et al., 2009), swimming was defined as the directed movement of the animal's head and body, and struggling was defined as more forceful movements than swimming, usually against the walls of the beaker. The water in the beaker was changed after each mouse.

2.3.2. Open field test

The forced swim test was conducted on the day after the forced swim test. Each mouse was placed individually into the center of a $40\text{ cm} \times 40\text{ cm}$ wooden box, which was divided into 16 equal squares. The mouse was left in the box for 10 min. The inner 4 squares were defined as the center and the outer 12 squares were defined as the periphery. Four behavioral measures were quantified for each mouse: the latency to leave the center start area (in sec), the amount of time spent in the center (in sec), the amount of time spent in the periphery (in sec), and the total distance traveled (in cm). All behaviors were coded using Ethovision software (version 3.0; Wageningen, The Netherlands).

2.4. Perfusions and tissue preparation

On day 24, the day after the open field test, all mice were anesthetized with 15% chloral hydrate (i.p.) and perfused transcardially with .9% saline and 4% paraformaldehyde in .1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). The brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde for 72 h at 4°C , and then they were placed in a .1 M phosphate buffered saline (PBS).1% (w/v) sodium azide solution at 4°C until sectioning. The brains were sectioned using a vibrating microtome (Vibratome 3000, Vibratome Company, St. Louis, MO) at $40\text{ }\mu\text{m}$ and the resulting sections were stored in cryoprotectant at -20°C until used for immunohistochemistry.

2.5. Immunohistochemistry

Every sixth section (1 in 6 series) was utilized for immunostaining and approximately 5 sections per animal were quantified. Immunohistochemistry was performed on free-floating brain sections as follows:

2.5.1. Reelin immunohistochemistry

The sections were washed in .1 M PBS and incubated in .3% (v/v) H_2O_2 in PBS for 30 min to block endogenous peroxidase activity. The sections were pre-incubated for 30 min in a blocking solution containing .3% (v/v) Triton X-100, 1.5% (v/v) normal horse serum (NHS), and 1% (v/v) bovine serum albumin (BSA) dissolved in PBS in order to block nonspecific antibody binding. The sections were then incubated for 48 h at 4°C with mouse anti-reelin primary antibody (Chemicon International, Temecula, CA) at 1:2000 diluted in a blocking solution. After incubation and PBS washes, the sections were incubated with biotinylated mouse anti-mouse IgG (1:200, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) secondary antibody diluted in .3% (v/v) Triton X-100 PBS at room temperature for 2 h. After another set of PBS washes, the sections were incubated for 1 h in an avidin–biotin complex (1:500, Vecta Stain Elite ABC reagent, Vector Labs, Burlingame, CA) at room temperature. The sections were stained using .033% (w/v), 3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) dissolved in .00786% (v/v) H_2O_2 and PBS. The reaction was stopped using PBS as a rinse. The sections were then mounted onto slides and left to dry overnight and then counterstained with cresyl violet and coverslipped using Entellan resin solution.

2.5.2. Doublecortin (DCX) immunohistochemistry

The sections were washed in PBS and incubated in sodium citrate (pH 6.0; 95°C) for 30 min. After 3 PBS washes, the sections were incubated for 24 h at room temperature with rabbit anti-DCX primary antibody (Cell Signaling, Danvers, MA) at 1:1000 diluted in a solution containing Triton X-100 (.5%, v/v), normal goat serum (NGS; 5%, v/v), and BSA (1%, w/v) dissolved in PBS. After incubation in the primary antibody, the sections were washed in PBS then incubated in 5% (v/v) H_2O_2 in PBS for 30 min to block endogenous peroxidase activity. The tissue was then incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:500, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) secondary antibody diluted in .5% (v/v) Triton X-100, 5% (v/v) NGS, and 1% (w/v) BSA in PBS for 1 h at room temperature. This was followed by incubation in an avidin–biotin complex (1:500, Vecta Stain Elite ABC reagent, Vector Labs) for 1 h at room temperature. After washes in PBS and 2 washes in .175 M sodium acetate, the sections were stained using .025% DAB and 4.167% NiSO_4 dissolved in .002% H_2O_2 and .175 M sodium acetate. The reaction was stopped using .175 M sodium acetate as

a rinse. The sections were then mounted onto slides and coverslipped using Entellan resin solution.

2.6. Analyses of immunohistochemical labeling

All analyses were conducted by individuals who were blind to the experimental conditions. The total number of reelin-positive cells and DCX-positive cells in the dentate gyrus was estimated using the unbiased optical fractionator method (West et al., 1991). Sections were examined at $400\times$ and $1000\times$ (oil immersion) magnification using a Nikon E800 microscope equipped with a motorized stage and a computerized stereology system (Stereo Investigator, version 9.0, MicroBrightField Inc, Williston, VT). DCX-positive cells were counted in the subgranular zone (SGZ) and granule cell layer (GCL) throughout the dorsal dentate gyrus (from -2.40 mm from bregma to approximately -3.94 mm from bregma, according to Paxinos and Watson, 1998). Reelin-positive cells were counted in the SGZ and hilus of the dentate gyrus from the same A–P plane as described above. The granule cell layer was not counted because there are typically very few reelin-positive cells located in this region. The total number of DCX-positive and reelin-positive cells was estimated using the following formula: $N_{\text{total}} : \Sigma Q^- \times 1/\text{ssf} \times A(x,y \text{ step})/a(\text{frame}) \times t/h$; where ΣQ^- is the number of counted cells; ssf is the section sampling fraction (1/6); $A(x,y \text{ step})$ is the area associated with each x,y movement ($5625\text{ }\mu\text{m}^2$); $a(\text{frame})$ is the area of the counting frame ($2500\text{ }\mu\text{m}^2$); t is the weighted average section thickness; and h is the height of the disector ($12\text{ }\mu\text{m}$). A guard zone of $5\text{ }\mu\text{m}$ was used during cell counting to avoid sectioning artifacts. Both hemispheres were quantified and combined for the statistical analyses.

To semi-quantify the morphology of the DCX-positive cells, dendritic branching in a subset of DCX-positive cells from each mouse was categorized according to the method described by Plumpe et al. (2006). Between 80 and 120 cells per animal were randomly selected using a meander scan method. Each cell was assigned to one of six categories based on the presence and extent of its apical dendrites (see Fig. 5). Briefly, categories 1 and 2 represented the proliferative stage of development and cells placed into these categories had either no processes (category 1) or one short process (category 2). Categories 3 and 4 represented an intermediate stage of cell development. Category 3 cells showed a medium process that reached the granular cell layer but did not extend into the molecular layer. Category 4 cells were similar except that they had a process that reached the molecular layer. Categories 5 and 6 represented more mature cell development. Category 5 cells had at least one major dendrite branching into the molecular layer. Category 6 cells had a defined dendritic tree with delicate branching within the granule cell layer. The percentage of cells falling into each of these categories was calculated for each animal.

2.7. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v 18.0, Chicago, IL). We examined the statistical significance of group differences in two different ways. First, we examined the effect of genotype and CORT dose using two-way ANOVAs for each measure (i.e., each behavior in the forced swim test and open field, reelin cell number, DCX cell number, and DCX cell category). Second, because we had hypothesized *a priori* that the HRM would be more affected by CORT than the WTM, we examined the effect of CORT on each measure using separate one-way ANOVAs for the HRM and WTM. This provided more statistical power for us to detect CORT effects within each strain of mouse. For all analyses, significant main effects were followed by Fisher's least significant difference post-hoc tests or post-hoc *t*-tests when appropriate. All results are represented as mean \pm standard error of the mean. The criterion for statistical significance was set at $p < .05$.

3. Results

3.1. Forced swim test behavior

Fig. 1 shows the effect of CORT on behavior in the forced swim test. A two-way ANOVA on immobility behavior revealed a significant main effect of CORT dose [$F(3,77) = 3.832, p < .02$] but no significant effect of genotype [$F(1,77) = .439, p > .50$] and no significant CORT dose by genotype interaction [$F(3,77) = 1.027, p > .38$]. Post-hoc analyses confirmed that the mice that received 20 mg/kg of CORT showed significantly more immobility behavior than the mice that received 10 mg/kg of CORT, 5 mg/kg of CORT or vehicle injections (all *p* values $< .05$). Similarly, a two-way ANOVA on swimming behavior revealed a significant main effect of CORT dose [$F(3,77) = 3.425, p < .03$] but no significant effect of genotype [$F(1,77) = .749, p > .38$] and no significant CORT dose by genotype interaction [$F(3,77) = .743, p > .53$]. Post-hoc analyses confirmed that the mice that received 20 mg/kg of CORT showed significantly

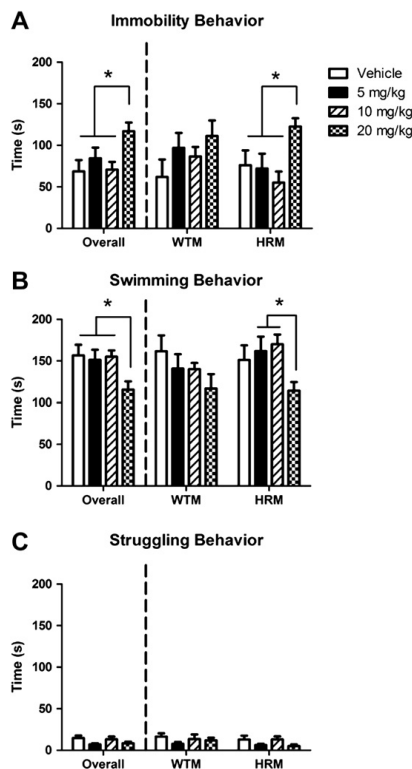


Fig. 1. The effect of CORT on behavior in the forced swim test: Panel A shows the time spent immobile, panel B shows the time spent swimming, and panel C shows the time spent struggling. Error bars represent the mean \pm standard error of the mean. Each panel shows the overall time spent by the WTM and HRM in each behavior and asterisks in this area represent the results of the two-way ANOVAs. The data are also shown with the WTM and HRM plotted separately, and in these cases, asterisks represent the results of the one-way ANOVAs within each genotype. CORT had dose-dependent effects on immobility and swimming behavior. The mice injected with 20 mg/kg CORT spent significantly more time immobile than the mice in the three other groups. The same pattern of results was seen within the HRM alone. Similarly, the mice injected with 20 mg/kg CORT spent significantly less time swimming than the mice in the three other groups. Within the HRM alone, the mice injected with 20 mg/kg CORT spent significantly less time swimming than the mice injected with 10 mg/kg CORT or 5 mg/kg CORT.

less swimming behavior than the mice that received 10 mg/kg of CORT, 5 mg/kg of CORT or vehicle injections (all p values $<.02$). Finally, a two-way ANOVA on struggling behavior revealed no significant main effects or interaction effects [all p values $>.089$], suggesting that none of the groups differed in the amount of struggling behavior.

Within the HRM only, one-way ANOVAs of each forced swim test behavior revealed significant main effects of CORT dose on immobility [$F(2,38) = 4.08, p < .02$] and swimming [$F(2,38) = 3.16, p < .04$]. Post-hoc analyses of these main effects further revealed that the HRM mice injected with 20 mg/kg CORT group showed significantly more immobility than the mice injected with 10 mg/kg CORT, 5 mg/kg CORT, or vehicle [all p values $<.04$]. In addition, the HRM mice injected with 20 mg/kg CORT showed significantly less

swimming than the mice injected with 10 mg/kg CORT or 5 mg/kg CORT [both p values $<.02$].

Within the WTM only, one-way ANOVAs of each forced swim test behavior revealed no significant effects [all p values $>.268$].

3.2. Open field behavior

Fig. 2 shows the effect of CORT on behavior in the open field test. Two-way ANOVAs on each measure in the open field revealed no significant main effects of genotype or CORT dose and no significant interactions between genotype and CORT dose [all p values $>.23$]. Similarly, one-way ANOVAs on each measure in the open field

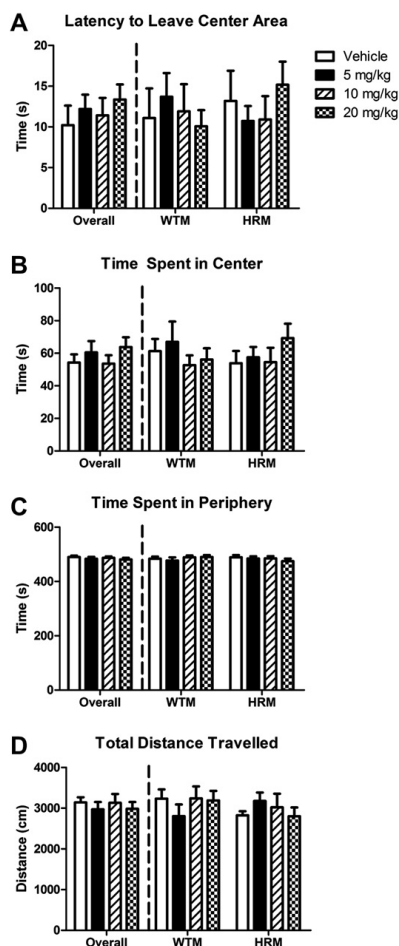


Fig. 2. The effect of CORT on behavior in the open field: Panel A shows the latency to leave the center area, panel B shows the time spent in the center, panel C shows the time spent in the periphery, and panel D shows the total distance traveled. Error bars represent the mean \pm standard error of the mean. Each panel shows the overall time spent by the WTM and HRM in each behavior, followed by the data for the WTM and HRM plotted separately. There were no significant genotype or dose differences in open field behavior.

within the HRM only or WTM only revealed no significant main effects of CORT [all p values $>.246$].

3.3. Reelin cell counts in the hilus and SGZ

Fig. 3 shows the effect of CORT on the number of reelin-positive cells in the SGZ and hilus. A two-way ANOVA of the number of reelin-positive cells in the SGZ revealed a significant main effect of genotype [$F(1,65) = 9.569, p < .003$] but no significant main effect of CORT dose [$F(3,65) = 1.557, p > .21$] and no significant CORT dose by genotype interaction [$F(3,65) = 1.299, p > .28$]. The main effect of genotype confirmed that in general, the HRM had significantly fewer reelin-positive cells in the SGZ than did the WTM. The same pattern of results was also seen in the hilus. A two-way ANOVA of

the number of reelin-positive cells in the hilus revealed a significant main effect of genotype [$F(1,65) = 6.735, p < .02$] but no significant main effect of CORT dose [$F(3,65) = 2.116, p > .10$] and no significant CORT dose by genotype interaction [$F(3,65) = .942, p > .42$].

From looking at Fig. 3, it is apparent that the significant genotype main effect described above is probably driven primarily by the sharp decrease in the number of reelin-positive cells in the HRM injected with 10 mg/kg CORT and 20 mg/kg CORT. To examine this possibility statistically, we compared the number of reelin-positive cells across genotype for each dose of CORT. We found that the HRM injected with 20 mg/kg CORT had significantly fewer reelin-positive cells in both the SGZ and hilus than the WTM injected with 20 mg/kg CORT [SGZ: $t(13) = 2.188$,

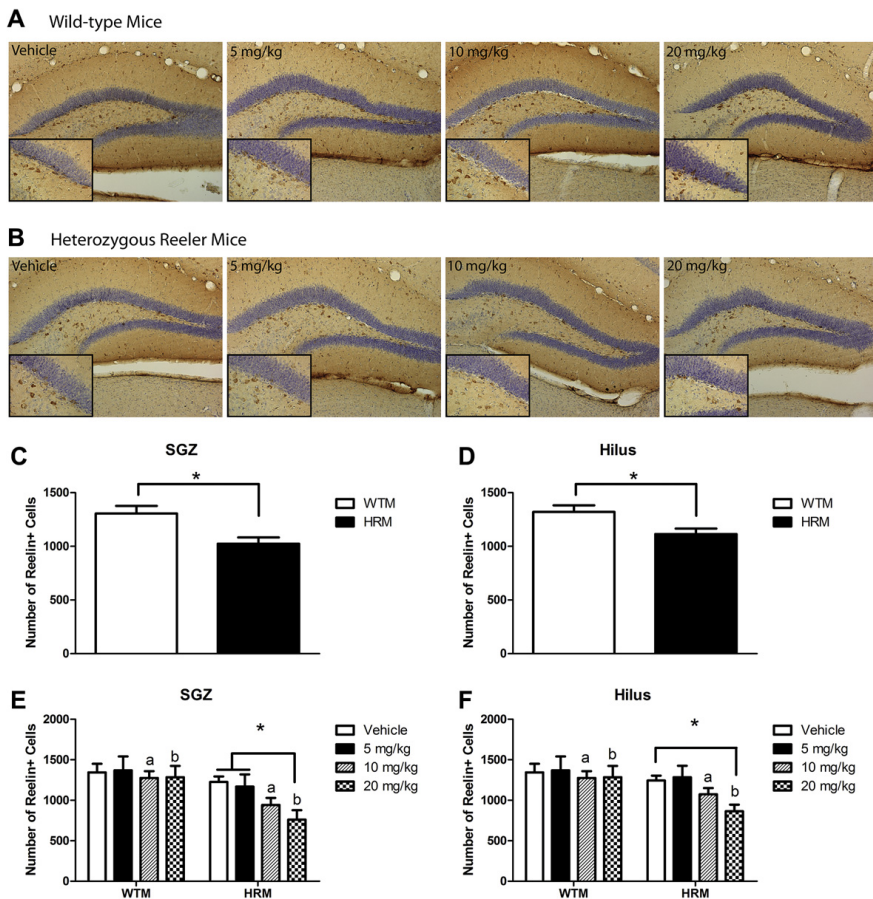


Fig. 3. The effect of CORT on the number of reelin-positive cells in the SGZ and hilus: Panel A shows representative micrographs of reelin immunoreactivity in the HRM. Panels C and D show the number of reelin-positive cells for all the WTM and HRM in both the SGZ and hilus. Panels E and F show the same data separated by dose of CORT. Error bars represent the mean \pm standard error of the mean. The HRM had significantly fewer reelin-positive cells in the SGZ and the hilus, showing a clear effect of genotype on this parameter. This effect was driven by the fact that the HRM injected with 10 mg/kg CORT or 20 mg/kg CORT had significantly fewer reelin-positive cells in the SGZ and hilus than the WTM injected with 10 mg/kg CORT or 20 mg/kg CORT (shown by a, b in the figure). Further analyses within each genotype separately revealed that the HRM injected with 20 mg/kg CORT had significantly fewer reelin-positive cells in the SGZ than the HRM injected with 5 mg/kg CORT or vehicle, and they had significantly fewer reelin-positive cells in the hilus than HRM injected with vehicle.

$p < .03$; hilus: $t(13) = 2.684$, $p < .01$). The HRM had 43% and 33% fewer reelin-positive cells than the WTM in the SGZ and hilus, respectively. Similarly, the HRM injected with 10 mg/kg CORT had significantly fewer reelin-positive cells in both the SGZ and hilus than the WTM injected with 10 mg/kg CORT [SGZ: $t(15) = 2.557$, $p < .02$; hilus: $t(15) = 1.791$, $p < .05$]. The HRM had 24% and 15% fewer reelin-positive cells than the WTM in the SGZ and hilus, respectively.

Within the HRM only, one-way ANOVAs revealed significant main effects of CORT dose on the number of reelin-positive cells in the SGZ and hilus [SGZ: $F(3,29) = 4.20$, $p < .02$; hilus: $F(3,29) = 4.42$, $p < .02$]. Post-hoc analyses of these main effects showed that the HRM mice injected with 20 mg/kg CORT group had significantly fewer reelin-positive cells in the SGZ and hilus than did the HRM mice injected with 5 mg/kg CORT or vehicle [all p values $< .02$]. In practical terms, the differences among these groups were quite large. In the SGZ, the HRM mice injected with 20 mg/kg CORT had 38% fewer reelin-positive cells than the vehicle-injected mice and 35% fewer reelin-positive cells than the mice injected with 5 mg/kg CORT. In the hilus, the HRM mice injected with 20 mg/kg CORT had 31% fewer reelin-positive cells than the vehicle-injected mice and 32.7% fewer reelin-positive cells than the mice injected with 5 mg/kg CORT.

Within the WTM only, one-way ANOVAs revealed no significant effects of any CORT dose on the number of reelin-positive cells in the SGZ or hilus [all p values $> .945$].

3.4. DCX cell counts in the SGZ and granule cell layer

Fig. 4 shows the effects of CORT on the number of DCX-positive cells. As is typical, these cells were primarily located in the subgranular zone and the inner one-third of the granule cell layer. The cells counts from both these regions were combined for the statistical analyses. A two-way ANOVA revealed a significant main effect of CORT dose [$F(3,48) = 7.711$, $p < .001$] but no significant effect of genotype [$F(1,48) = .211$, $p > .64$] and no significant CORT dose by genotype interaction [$F(3,48) = .750$, $p > .52$]. Post-hoc analyses showed a number of differences among the groups. First, the mice that received 20 mg/kg of CORT had significantly fewer DCX-positive cells than did the mice that received 5 mg/kg of CORT [$p < .001$] or vehicle [$p < .02$]. The difference between the 20 mg/kg mice and the 10 mg/kg mice narrowly missed statistical significance [$p < .06$]. Second, the mice that received 10 mg/kg CORT had significantly fewer DCX-positive cells than did the mice that received vehicle [$p < .008$]. And finally, the mice that received 5 mg/kg CORT had significantly fewer DCX-positive cells than did the mice that received vehicle [$p < .04$].

Within the HRM only, a one-way ANOVA revealed a significant main effect of CORT dose on DCX cell number [$F(3,23) = 9.133$, $p < .001$]. Post-hoc analyses of this main effect revealed that the HRM mice injected with each dose of CORT had fewer DCX-positive cells than the mice injected with vehicle [all p values $< .012$]. There was a 34%, 37%, and 63% decrease in the number of DCX-positive

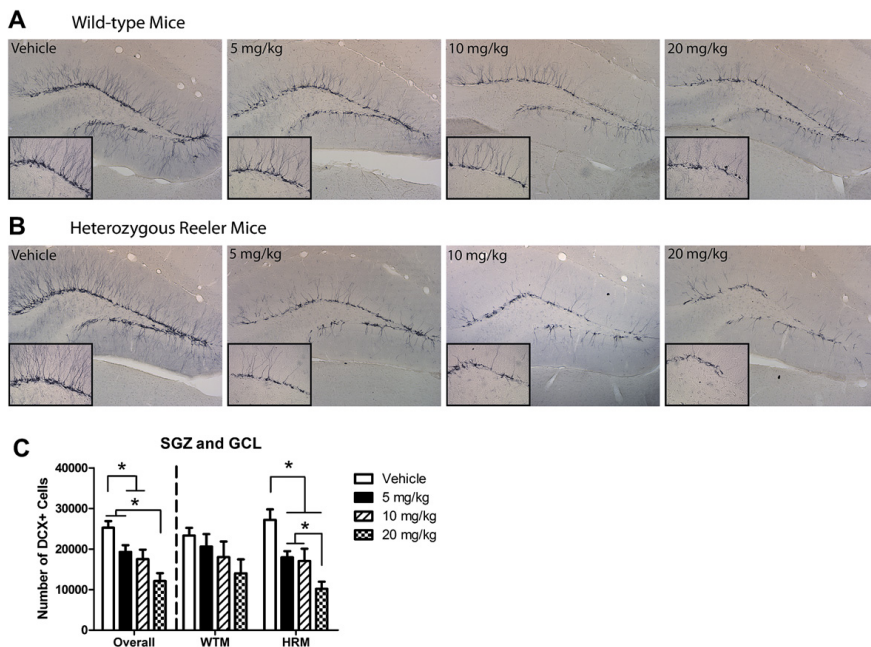


Fig. 4. The effect of CORT on the number of DCX-positive cells in the SGZ and GCL: Panel A shows representative micrographs of DCX immunoreactivity in the WTM and panel B shows representative micrographs of DCX immunoreactivity in the HRM. Panel C shows the quantified results of the DCX cell counts. Error bars represent the mean \pm standard error of the mean. As in the previous figures, the data are plotted first with all mice from both genotypes combined and asterisks in this area represent the results of the two-way ANOVA. The data are also shown with the WTM and HRM plotted separately, and asterisks in these areas represent the results of the one-way ANOVAs within each genotype. CORT had dose-dependent effects on the number of DCX-positive cells. The mice injected with 20 mg/kg CORT had fewer DCX-positive cells than the mice injected with 5 mg/kg CORT or vehicle. In addition, the mice injected with 5 mg/kg CORT or 10 mg/kg CORT had fewer DCX-positive cells than the mice injected with vehicle. Within the HRM alone, all doses of CORT significantly decreased the number of DCX-positive cells. Furthermore, the HRM injected with 20 mg/kg CORT had significantly fewer DCX-positive cells than the HRM injected with 10 mg/kg or 5 mg/kg CORT.

cells seen in the HRM mice injected with 5 mg/kg CORT, 10 mg/kg CORT, and 20 mg/kg CORT, respectively. In addition, the HRM mice injected with 20 mg/kg CORT had significantly fewer DCX-positive cells than the HRM mice injected with 10 mg/kg CORT or 5 mg/kg CORT [both p values $< .05$]. The mice injected with 20 mg/kg CORT had 40.21% and 43.23% fewer DCX-positive cells than the mice injected with 10 mg/kg CORT and 5 mg/kg CORT, respectively.

Within the WTM only, a one-way ANOVA revealed no significant effect of CORT dose on the number of DCX-positive cells [$F(3,23) = 1.587, p > .22$].

3.5. DCX dendritic morphology

Fig. 5A shows the categorization of DCX-positive cells across all groups. Consistent with Plumpe et al. (2006), the DCX-positive cells showed a range of morphological complexity, from essentially no dendritic branching to well defined and complex branches. Each panel of Fig. 5B shows the results for one of the six categories. In general, CORT appeared to slow DCX cell maturation, with more category 1 cells and fewer category 4, 5, and 6 cells in the CORT-injected rats. A two-way ANOVA on the percentage of category 1

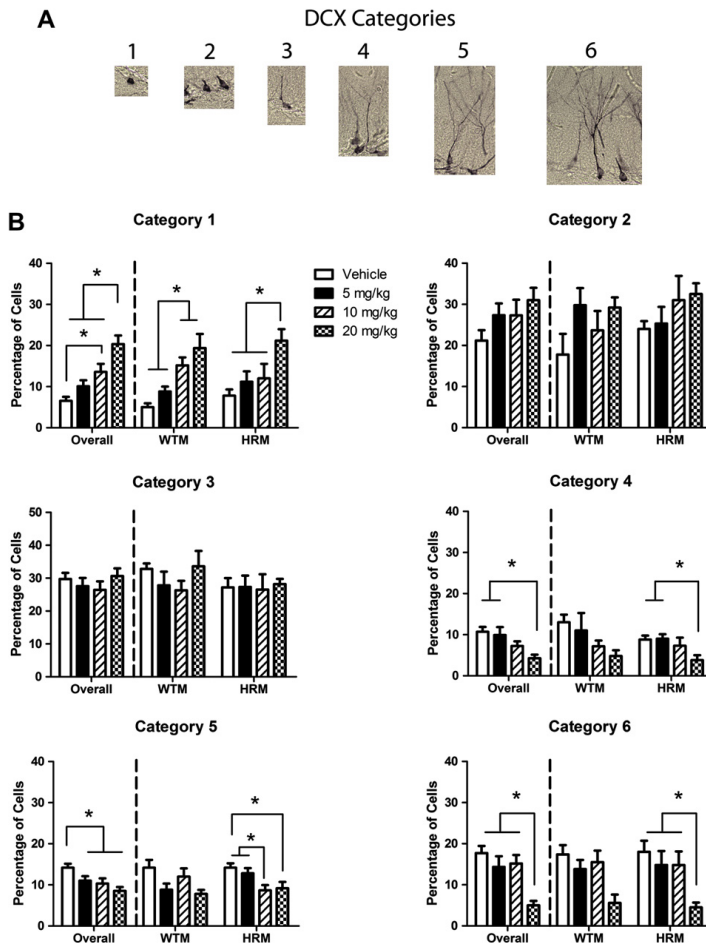


Fig. 5. The effect of CORT on dendritic complexity within DCX-positive cells: Panel A provides an example of each of the 6 categories of dendritic complexity used in this analysis. Panel B shows the percentage of cells placed into each category for the mice in each group. Error bars represent the mean \pm standard error of the mean. As in the previous figures, the data are plotted first with all mice from both genotypes combined and asterisks in this area represent the results of the two-way ANOVAs. The data are also shown with the WTM and HRM plotted separately, and asterisks in these areas represent the results of the one-way ANOVAs within each genotype. CORT had dose-dependent effects on the percentage of cells in categories 1, 4, 5, and 6, with an overall increase in the percentage of DCX-positive cells that fell into category 1 (i.e., more immature cells) and an overall decrease in the percentage of cells that fell into categories 4, 5, and 6 (more complex dendrites). Within the HRM alone, the mice injected with 20 mg/kg CORT had significantly more category 1 cells and significantly fewer category 6 cells than the HRM in all other groups. They also had significantly fewer category 4 cells than the HRM injected with 5 mg/kg CORT or vehicle, and significantly fewer category 5 cells than the HRM injected with vehicle. In addition, the HRM injected with 10 mg/kg CORT had significantly fewer DCX-positive cells than the HRM injected with 5 mg/kg CORT or vehicle. Finally, the WTM injected with 10 mg/kg or 20 mg/kg CORT had significantly more category 1 cells than the WTM injected with 5 mg/kg CORT or vehicle.

cells revealed a significant main effect of CORT dose [$F(3,45) = 11.166, p < .001$] but no significant effect of genotype [$F(1,45) = .294, p > .59$] and no significant CORT dose by genotype interaction [$F(3,45) = .659, p > .58$]. Post-hoc analyses of this effect revealed that the mice injected with 20 mg/kg CORT had significantly more category 1 cells than the mice injected with 10 mg/kg CORT, 5 mg/kg CORT, or vehicle [all p 's $< .009$]. In addition, the mice injected with 10 mg/kg CORT had significantly more category 1 cells than did the vehicle-injected mice [$p < .007$].

There were no significant main effects or interaction effects for the category 2 or 3 cells [all p values $> .13$]. However, a two-way ANOVA on the percentage of category 4 cells revealed a significant main effect of CORT dose [$F(3,45) = 4.727, p < .007$] but no significant effect of genotype [$F(1,45) = 1.651, p > .207$] and no significant CORT dose by genotype interaction [$F(3,45) = .468, p > .707$]. Post-hoc analyses revealed that the mice injected with 20 mg/kg CORT had significantly fewer category 4 cells than the mice injected with 5 mg/kg CORT or vehicle [all p 's $< .006$]. Similar effects were seen for the category 5 and 6 cells. In both cases, two-way ANOVAs revealed significant main effects of CORT dose [category 5: $F(3,45) = 4.962, p < .005$; category 6: $F(3,45) = 7.077, p < .001$] but no significant effects of genotype [category 5: $F(1,45) = .001, p > .987$; category 6: $F(1,45) = .001, p > .987$] and no significant CORT dose by genotype interactions [category 5: $F(3,45) = .06, p > .981$; category 6: $F(3,45) = .06, p > .981$]. Post-hoc tests revealed that the mice injected with all doses of CORT had significantly fewer category 5 cells than the mice injected with vehicle [all p 's $< .05$], and that the mice injected with 20 mg/kg CORT had significantly fewer category 6 cells than the mice in all other groups [all p 's $< .003$].

Within the HRM only, a one-way ANOVA revealed a significant main effect of CORT dose on the percentage of category 1, 4, 5, and 6 cells [category 1: $F(3,23) = 4.471, p < .02$; category 4: $F(3,23) = 3.122, p < .05$; category 5: $F(3,23) = 4.321, p < .02$; category 6: $F(3,23) = 4.466, p < .02$]. Post-hoc analyses of these main effects revealed several group differences. First, the HRM injected with 20 mg/kg CORT had significantly more category 1 cells than the mice in all other groups [all p values $< .03$]. Second, the HRM injected with 20 mg/kg had significantly fewer category 4 cells than the mice injected with 5 mg/kg CORT or vehicle [both p values $< .02$]. Third, the HRM injected with 20 mg/kg CORT had significantly fewer category 5 cells than the vehicle-injected mice [$p < .02$]. The difference in category 5 cells between the mice injected with 20 mg/kg CORT and those injected with 5 mg/kg narrowly missed statistical significance [$p < .061$]. Fourth, the HRM injected with 10 mg/kg CORT had significantly fewer category 5 cells than did the mice injected with 5 mg/kg CORT or vehicle [both p values $< .04$]. And finally, the HRM injected with 20 mg/kg had significantly fewer category 6 cells than the HRM mice injected with 10 mg/kg CORT, 5 mg/kg CORT, or vehicle [all p values $< .02$].

There was also a significant main effect of CORT dose on the percentage of category 1 cells in the WTM [$F(3,20) = 9.073, p < .001$]. Post-hoc analyses of this effect revealed that the WTM injected with 20 mg/kg CORT or 10 mg/kg CORT had significantly more category 1 cells than the WTM injected with 5 mg/kg CORT or vehicle [all p values $< .05$]. There were no other significant differences in DCX cell category for the WTM, but the differences in category 5 cells and category 6 cells narrowly missed statistical significance [$p > .065$ for category 5 and $p > .069$ for category 6].

4. Discussion

The results of this experiment can be summarized as follows. We found that 21 days of repeated CORT administration produced dose-dependent increases in depression-like behavior and

decreases in neurogenesis that are consistent with the results of previous experiments (for a review see Sterner and Kalynchuk, 2010). CORT also decreased dendritic complexity in newly born dentate granule cells, suggesting that the rate of cell maturation is compromised in mice exposed to high levels of glucocorticoids. Interestingly, there were no differences between the vehicle-injected HRM and WTM in depression-like behavior, the number of reelin-positive cells in the SGZ and hilus, or hippocampal neurogenesis and neuronal maturation. However, the effects of CORT on behavior, reelin cell number, and neurogenesis were more pronounced in the HRM than in the WTM, providing support for the idea that mice with impaired reelin signaling may be more vulnerable to the deleterious effects of glucocorticoids. These findings are discussed in more detail in the following paragraphs.

4.1. Effect of CORT on depression-like behavior

CORT had significant effects on depression-like behavior in this experiment. The highest dose of 20 mg/kg increased the time spent immobile and decreased the time spent swimming in the forced swim test, which are measures typically used to infer a depressive phenotype in rats and mice (Porsolt et al., 1977; Cryan et al., 2005; Gregus et al., 2005). Importantly, these effects occurred independently of nonspecific changes in motoric behavior, as the CORT-injected rats showed a similar amount of exploration in the open field compared to vehicle-injected rats. These results are consistent with previous findings (Marks et al., 2009), and reinforce the idea that the depressogenic effects of exogenous CORT administration are time- and dose-dependent. We have worked extensively with a rat paradigm of exogenous CORT administration and our studies have revealed that 21 days, but not 1 day, of 40 mg/kg CORT injections produce large and reliable increases in depression-like behavior, whereas 21 days of 20 mg/kg injections produce smaller and less reliable increases and 21 days of 10 mg/kg injections produce no increases in depression-like behavior (Kalynchuk et al., 2004; Gregus et al., 2005; Johnson et al., 2006; Marks et al., 2009). Results reported by other researchers largely confirm these observations. Brummelte et al. (2006) found that 26 days of 40 mg/kg CORT increased forced swim test immobility and Hill et al. (2003) found the same result with 20 days of 20 mg/kg CORT injections. However, a 20 mg/kg dose given for at least 20 days appears to be the minimum amount required for eliciting a depressive phenotype because Brotto et al. (2001) found no behavioral effects with only 10 days of 20 mg/kg CORT injections. Work in mice has confirmed this observation, as Zhao et al. (2008, 2009) reported that c57 mice injected with 20 mg/kg CORT for 21, 35, or 36 days show increased immobility behavior but mice injected with 20 mg/kg CORT for either 6 or 18 days do not. Taken together, our findings and those of previous studies confirm that medium to high dose CORT administration can produce depressogenic effects in both rats and mice, and further validate the value of this approach for understanding the relationship between glucocorticoids and depressive behavior.

4.2. Effect of CORT on hippocampal neurogenesis

CORT also had significant effects on hippocampal neurogenesis in this experiment. This is not a novel finding: Numerous previous reports have shown that exposure to chronic stress or glucocorticoids causes rapid and robust decreases in hippocampal cell proliferation and survival in the adult rodent brain (e.g., Sheline, 2000; Pham et al., 2003; Wong and Herbert, 2006; Brummelte and Galea, 2010). However, we believe that our results are the first to show that a dose as low as 5 mg/kg can decrease neurogenesis in mice. We found that all doses of CORT significantly decreased the number of DCX-positive cells in the subgranular zone

and granule cell layer. Our results also showed that CORT decreases dendritic complexity in surviving newly born neurons. In general, a greater percentage of DCX-positive cells from CORT-injected mice had no or little dendritic branching compared to the vehicle-injected mice. Similarly, a smaller percentage of DCX-positive cells from CORT-injected mice had extensive dendritic branching. Both of these effects increased with the dose of CORT given. Interestingly, Wong and Herbert (2004, 2006) recently showed that dentate granule cells born under conditions of high glucocorticoid levels are less likely to survive and less likely to take on a neuronal phenotype if they do survive. Our results take this one step further, and suggest that even if cells do survive, they may be slow to mature and integrate into existing circuitry. An important implication of this finding is that glucocorticoid-induced decreases in neurogenesis may not be the only issue to consider in the context of mood disorders. The cells that do survive may do so abnormally, contributing to disrupted hippocampal plasticity and function. If these cells are involved in the expression of depressive symptoms, then strategies that can repair them may have antidepressant properties. This idea is speculative, but it may be a fruitful topic for future investigation.

One other interesting observation from the present results is that all doses of CORT significantly decreased the number of DCX-positive cells, but only the highest dose of CORT increased immobility behavior in the forced swim test. On the surface, this suggests that the effects of CORT on cell proliferation and survival and depression-like behavior may not be completely in sync. This is relevant to the prominent hypothesis that deficient hippocampal neurogenesis may play a causal role in depression (Duman and Charney, 1999; Jacobs et al., 2000; Dranovsky and Hen, 2006). This hypothesis has been quite controversial, with support gathered from reports that antidepressants increase neurogenesis while stress decreases it (reviewed by Kempermann and Kronenberg, 2003), and resistance building from observations that neurogenesis can be dissociated from depression-like behavior in some preclinical animal models and that it may not be decreased in post-mortem tissue from patients with depression (e.g., Vollmayr et al., 2003; Reif et al., 2006). Nevertheless, the vast majority of current data support the idea that deficient neurogenesis plays a role in the pathogenesis of depression. One possible interpretation of our results is that neurogenesis must dip below a certain level before functional consequences emerge. Our data show that CORT had graded effects on the number of DCX-positive cells, with cell number becoming increasingly smaller as the dose of CORT increased. Overall, the 20 mg/kg dose produced about a 50% decrease in the number of DCX-positive cells. In addition, the 20 mg/kg dose was the only one to significantly increase the percentage of DCX-positive cells with no dendritic arborization and decrease the percentage of DCX-positive cells with extensive dendritic branching and this is consistent with the fact that the 20 mg/kg dose was the only one to significantly increase depression-like behavior in the forced swim test. This suggests to us that the combined effect of a substantial loss of proliferating and surviving cells along with a deficit in dendritic maturation in surviving cells could be necessary for depressive symptoms to become apparent.

4.3. Differential effects of CORT in the WTM and HRM

An important aspect of the present study was to determine whether HRM were more sensitive to the depressogenic effects of CORT than WTM. Our results appear to generally support this idea. The vehicle-injected HRM and WTM showed very similar patterns of behavior in the forced swim test and open field and they also did not differ in terms of the number of reelin-positive and DCX-

positive cells in regions of the dentate gyrus that were examined in this experiment. Although there are numerous subtle behavioral, neuroanatomical, and neurochemical differences between HRM and WTM (reviewed in Tueting et al., 2006), our results suggest that the effect of genotype per se is not sufficient to produce differences in depressive behavior, exploratory behavior, or the number of reelin-positive and DCX-positive cells. However, when we examined the effects of CORT within each genotype, we found dose-dependent effects of CORT in the HRM that were not observed in the WTM, such as increased immobility and decreased swimming in the forced swim test, decreased reelin-positive cells in the SGZ and hilus, decreased DCX-positive cells in the SGZ and GCL, and decreased dendritic complexity within DCX-positive cells. The fact that the HRM express less than normal levels of reelin may have contributed to their vulnerability to CORT. A direct comparison between the HRM and WTM in the number of reelin-positive cells located in the SGZ showed that the number of reelin-positive cells was significantly reduced in the HRM with respect to WTM at CORT doses of 10 mg/kg and 20 mg/kg. This type of genotype effect was not apparent for the number of DCX-positive cells, which suggests a bigger effect of CORT on reelin-positive cells that are already intrinsically altered in HRM (i.e., because they express only about one-half of reelin levels than WTM littermates, see Tueting et al., 1999). The effect of CORT on the number of reelin-positive cells in the SGZ, the site of adult neurogenesis, may have led to a secondary decrease in the number of DCX-positive cells. In a previous paper, we have shown that CORT treatment specifically affects the number of reelin-positive pyramidal-basket cells located in the dentate subgranular zone, and we have hypothesized that these cells may influence the integration of newborn granule cells by secreting reelin into the dentate granule cell layer (Lussier et al., 2009). We have also recently demonstrated that a subpopulation of reelin-positive pyramidal-basket cells in the dentate gyrus co-express neuronal nitric oxide synthase, and that this co-expression is reduced in HRM, and we have proposed that the production of nitric oxide by these cells may make them more vulnerable to the deleterious effects of glucocorticoids (Romay-Tallon et al., 2010). A loss of reelin-positive pyramidal-basket cells under conditions of high glucocorticoids would accordingly decrease the integration of newborn granule cells. This idea is consistent with the very recent report of Pujadas et al. (2010), who found that transgenic mice overexpressing reelin show increased hippocampal neurogenesis, hypertrophy of dendritic spines, and enhanced long-term potentiation. This implies that the higher vulnerability of reelin-positive dentate pyramidal-basket cells to CORT treatment in the HRM could be the trigger for subsequent deficits in DCX-positive cell number and integration, and secondarily, the expression of depression-like behavior.

An important question that needs to be addressed in any preclinical animal study of psychiatric illness is how well the results mirror the human condition. A specific deficit in the number of hippocampal CA4 reelin-positive cells has been shown – albeit at a non-significant level – in post-mortem samples of patients with depression (Fatemi et al., 2000). It is possible that a more detailed count of specific types of reelin-positive cells (i.e., identifying SGZ pyramidal-basket cells and other hilar cells) could reveal significant deficits in reelin-positive cells in post-mortem tissue from depressed human subjects. A deficit in reelin-positive pyramidal-basket cells associated with human depression would strengthen our idea discussed above about expanding experimental examinations of deficient neurogenesis in depression to include studies on newborn cell maturation and integration in the granule cell layer.

One should also point out that hippocampal reelin appears to have a prominent role in regulating working memory and

hippocampal long-term potentiation (Weeber et al., 2002; Krueger et al., 2006; Qiu et al., 2006; Levenson et al., 2008; Wedenoja et al., 2010), and given the cognitive deficits associated with psychiatric disorders showing decreased hippocampal reelin (e.g., schizophrenia, bipolar disorder, depression, and autism), it would be of interest in future studies to analyze cognitive performance in HRM treated with CORT. This could help enhance our understanding of the potential interaction between hippocampal reelin levels and cognitive alterations in these disorders.

As discussed above, the results of this experiment suggest that a deficit in reelin could increase vulnerability to the depressogenic effects of CORT, and as such, a general reelin decrease of possible genetic and/or epigenetic origin could be operative as a primary event in a two-hit model of depression. It is difficult to reconcile this idea with the current human literature, and more studies are needed from both the preclinical and clinical literature on this topic. On one hand, it should be noted that post-mortem brain studies to date have not revealed widespread alterations in reelin expression associated with depression, whereas these kinds of alterations are found in schizophrenia, and to a lesser degree in bipolar disorder (Fatemi et al., 2000, 2005; Guidotti et al., 2000). On the other hand, recent data have confirmed that chronic psychotropic drug treatment with antidepressants such as fluoxetine, or atypical antipsychotics such as olanzapine, increase the level of reelin expression, whereas typical antipsychotics like haloperidol, or mood stabilizers like lithium, showed the opposite effect (Fatemi et al., 2009). Perhaps the best way to conceptualize our data given what is currently known about depression and reelin from human studies is to consider them with a broader perspective. Depressive symptoms are observed in early stage and prodromal schizophrenia (Hafner et al., 2005a, 2005b), and post-mortem brain studies by Reif et al. (2006) have suggested that an alteration in hippocampal neurogenesis may be more characteristic of schizophrenia than of major depression. These data suggest that a developmental deficit in reelin could underlie a susceptibility to stress-related depressive symptoms within a number of psychiatric illnesses that have been associated with a deficit in reelin. For example, this could help explain the onset of depressive symptoms during the prodromal stage of schizophrenia, and therefore, the HRM–CORT treated mouse could provide an interesting two-hit model of the early stages schizophrenia before the onset of psychotic symptoms. Additional studies addressing behavioral, neurochemical and neuroanatomical alterations in the HRM–CORT model are needed to evaluate the validity of this idea in correlation with behavioral and/or imaging studies in the early course of schizophrenia and other psychiatric illnesses in human patients.

5. Conclusions

Our results confirm the depressogenic effects of repeated CORT treatment in mice, and show that HRM have a higher level of vulnerability to the depressogenic effects of CORT than WTM, both in terms depression-like behavior and in terms of hippocampal neurogenesis–cell maturation. This suggests that depression and/or depressive symptoms may arise from a similar kind of two-hit scenario that has previously been suggested to occur in schizophrenia. Additional studies are necessary to evaluate the degree to which this HRM–CORT model approximates the behavioral and neurobiological correlates of depression or of depressive symptoms in other psychiatric illnesses such as prodromal stage schizophrenia.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge grant support from Xunta de Galicia (PGIDIT06PXIB200166PR) and the Spanish Ministry of Science and

Technology and FEDER (SAF2007-62766) to HJC, and grant support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to LEK. LEK is also supported by the Canada Research Chairs Program of Canada. HJC would like to dedicate this paper to the memory of his long-time mentor and friend Dr. Erminio Costa.

References

- Abraham, H., Meyer, G., 2003. Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. *Hippocampus* 13, 715–727.
- Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., Soriano, E., 1998. Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J. Neurosci.* 18, 7779–7799.
- Ammasari-Teule, M., Sgobio, C., Biamonte, F., Marrone, C., Mercuri, N.B., Keller, F., 2009. Reelin haploinsufficiency reduces the density of PV+ neurons in circumscribed regions of the striatum and selectively alters striatal-based behaviors. *Psychopharmacology (Berl.)* 204, 511–521.
- Barr, A.M., Kenneth, N.F., Markou, A., Honer, W.G., 2008. Heterozygous reeler mice exhibit alterations in sensorimotor gating but not presynaptic proteins. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2568–2574.
- Belmaker, R.H., Agam, G., 2008. Major depressive disorder. *N. Eng. J. Med.* 358, 55–68.
- Brigman, J.L., Padukewicz, K.E., Sutherland, M.L., Rothblat, L.A., 2006. Executive functions in the heterozygous reeler mouse model of schizophrenia. *Behav. Neurosci.* 120, 984–988.
- Broto, L.A., Gorzalka, B.B., Barr, A.M., 2001. Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behaviours in aged male and female rats. *Eur. J. Pharmacol.* 424, 203–209.
- Brummelte, S., Galea, L.A., 2010. Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats. *Neuroscience* 168, 680–690.
- Brummelte, S., Pawluski, J.L., Galea, L.A., 2006. High post-partum levels of corticosterone given to dams influence postnatal hippocampal cell proliferation and behavior of offspring: a model of post-partum stress and possible depression. *Horm. Behav.* 50, 370–382.
- Burke, H.M., Davis, M.C., Otte, C., Mohr, D.C., 2005. Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 30, 846–856.
- Cryan, J.F., Valentino, R.J., Lucki, I., 2005. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 547–569.
- D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.L., Curran, T., 1995. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719–723.
- Drakew, A., Deller, T., Helmrich, B., Gebhardt, C., Del Turco, D., Tielsch, A., Forster, E., Herz, J., Frotscher, M., 2002. Dentate granule cells in reeler mutants and VLDLR and ApoE2 knockout mice. *Exp. Neurol.* 176, 12–24.
- Dranovsky, A., Hen, R., 2006. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol. Psychiatry* 59, 1136–1143.
- Duman, R.S., Charney, D.S., 1999. Cell atrophy and loss in major depression. *Biol. Psychiatry* 45, 1083–1084.
- Eastwood, S.L., Harrison, P.J., 2006. Cellular basis of reduced cortical reelin expression in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 163, 540–542.
- Fatemi, S.H., Earle, J.A., McMenomy, T., 2000. Reduction in reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Mol. Psychiatry* 5, 654–663.
- Fatemi, S.H., Kroll, J.L., Stary, J.M., 2001. Altered levels of reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *NeuroReport* 12, 3209–3215.
- Fatemi, S.H., Reutiman, T.J., Folsom, T.D., 2009. Chronic psychotropic drug treatment causes differential expression of reelin signaling system in frontal cortex of rats. *Schizophr. Res.* 111, 138–152.
- Fatemi, S.H., Stary, J.M., Earle, J.A., Araghi-Niknam, M., Eagan, E., 2005. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and reelin proteins in cerebellum. *Schizophr. Res.* 72, 109–122.
- Fava, M., Kendler, K.S., 2000. Major depressive disorder. *Neuron* 28, 335–341.
- Forster, E., Jossin, Y., Zhao, S., Chai, X., Frotscher, M., Goffinet, A.M., 2006. Recent progress in understanding the role of reelin in radial neuronal migration, with specific emphasis on the dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 23, 901–909.
- Frotscher, M., Haas, C.A., Forster, E., 2003. Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cereb. Cortex* 13, 634–640.
- Gong, C., Wang, T.W., Huang, H.S., Parent, J.M., 2007. Reelin regulates neural progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 1803–1811.
- Gregus, A., Wintink, A.J., Davis, A.C., Kalynchuk, L.E., 2005. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav. Brain Res.* 156, 105–114.
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J.M., DiGiorgi-Gerevini, V., Dwivedi, Y., Grayson, D.R., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesold, C., Sharma, R., Uzunov, D., Costa, E., 2000. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 1061–1069.
- Hafner, H., Maurer, K., Trendler, G., an der Heiden, W., Schmidt, M., 2005a. The early course of schizophrenia and depression. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci* 255, 167–173.

- Hafner, H., Maurer, K., Trendler, G., der Heiden, W., Schmidt, M., Konnecke, R., 2005b. Schizophrenia and depression: challenging the paradigm of two separate diseases – a controlled study of schizophrenia, depression and healthy controls. *Schizophr. Res.* 77, 11–24.
- Herz, J., Chen, Y., 2006. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 850–859.
- Hill, M.N., Broetto, L.A., Lee, T.T., Gorzalka, B.B., 2003. Corticosterone attenuates the antidepressant-like effects elicited by melatonin in the forced swim test in both male and female rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 905–911.
- Impagnatiello, F., Guidotti, A.R., Pesold, C., Dwivedi, Y., Caruncho, H., Pisu, M.G., Uzunov, D.P., Smalheiser, N.R., Davis, J.M., Pandey, G.N., Pappas, G.D., Tueting, P., Sharma, R.P., Costa, E., 1998. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15718–15723.
- Jacobs, B.L., 2002. Adult brain neurogenesis and depression. *Brain Behav. Immun.* 16, 602–609.
- Jacobs, B.L., van Praag, H., Gage, F.H., 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry* 5, 262–269.
- Johnson, S.A., Fournier, N.M., Kalynchuk, L.E., 2006. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav. Brain Res.* 168, 280–288.
- Kalynchuk, L.E., Gregus, A., Boudreau, D., Perrot-Sinal, T.S., 2004. Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats. *Behav. Neurosci.* 118, 1365–1377.
- Kempermann, G., Kronenberg, G., 2003. Depressed new neurons-adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol. Psychiatry* 54, 499–503.
- Knable, M.B., Barci, B.M., Webster, M.J., Meador-Woodruff, J., Torrey, E.F., 2004. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings form the Stanley Neuropathology Consortium. *Mol. Psychiatry* 9, 609–620.
- Koo, J.W., Russo, S.J., Fergusson, D., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2010. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2669–2674.
- Krueger, D.D., Howell, J.L., Hebert, B.F., Olsson, P., Taylor, J.R., Nairn, A.C., 2006. Assessment of cognitive function in the heterozygous reeler mouse. *Psychopharmacology* 189, 95–104.
- Levenson, J.M., Qiu, S., Weeber, E.J., 2008. The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1179, 422–431.
- Levinson, D.F., 2006. The genetics of depression: a review. *Biol. Psychiatry* 60, 84–92.
- Liu, W.S., Pesold, C., Rodriguez, M.A., Carboni, G., Auta, J., Lacor, P., Larson, J., Condie, B.G., Guidotti, A., Costa, E., 2001. Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3477–3482.
- Lussier, A.L., Caruncho, H.J., Kalynchuk, L.E., 2009. Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of reelin-positive cells in the adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 460, 170–174.
- MacLaurin, S.A., Krucker, T., Fish, K.N., 2007. Hippocampal dendritic arbor growth in vitro: regulation by reelin-disabled-1 signaling. *Brain Res.* 1172, 1–9.
- Marks, W., Fournier, N.M., Kalynchuk, L.E., 2009. Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength. *Physiol. Behav.* 98, 67–72.
- Maynard, T.M., Sikich, L., Lieberman, J.A., LaMantia, A.S., 2001. Neural development, cell-cell signaling, and the “two-hit” hypothesis of schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 27, 457–476.
- Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M.O., Anisman, H., 2004. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J. Neurosci.* 24, 1478–1485.
- Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M., D’Arcangelo, G., 2004. Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* 41, 71–84.
- Niu, S., Yabut, O., D’Arcangelo, G., 2008. The reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 28, 10339–10348.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Pesold, C., Impagnatiello, F., Pisu, M.G., Uzunov, D.P., Costa, E., Guidotti, A., Caruncho, H.J., 1998. Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3221–3226.
- Pesold, C., Liu, W.S., Guidotti, A., Costa, E., Caruncho, H.J., 1999. Cortical bifurcated, horizontal and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3217–3222.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P.R., McEwen, B.S., 2003. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 17, 879–886.
- Plumpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Romer, B., Rodriguez, G.R., Kronenberg, G., Kempermann, G., 2006. Variability of double-cortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci.* 7, 77.
- Porsolt, R.D., Le, P.M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.
- Pujadas, L., Gruart, A., Bosch, C., Delgado, L., Teixeira, C.M., Rossi, D., de Lecea, L., Martínez, A., Delgado-García, J.M., Soriano, E., 2010. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J. Neurosci.* 30, 4636–4649.
- Qiu, S., Korwek, K.M., Pratt-Davis, A.R., Peters, M., Bergman, M.Y., Weeber, E.J., 2006. Cognitive disruption and altered hippocampus synaptic function in reelin haploinsufficient mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 85, 228–242.
- Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A., Lesch, K.P., 2006. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol. Psychiatry* 11, 514–522.
- Rodriguez, M.A., Caruncho, H.J., Costa, E., Pesold, C., Liu, W.S., Guidotti, A., 2002. In patas monkey, glutamic acid decarboxylase-67 and reelin mRNA coexpression varies in a manner dependent on layers and cortical areas. *J. Comp. Neurol.* 451, 279–288.
- Rodriguez, M.A., Pesold, C., Liu, W.S., Kriho, V., Guidotti, A., Pappas, G.D., Costa, E., 2000. Colocalization of integrin receptors and reelin in dendritic spine postsynaptic densities of adult nonhuman primate cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3550–3555.
- Romay-Tallon, R., Dopeso-Reyes, I.G., Lussier, A.L., Kalynchuk, L.E., Caruncho, H.J., 2010. The coexpression of reelin and neuronal nitric oxide synthase in a subpopulation of dentate gyrus neurons is downregulated in heterozygous reeler mice. *Neural Plast.* 2010 130429.
- Sheline, Y.L., 2000. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. *Biol. Psychiatry* 48, 791–800.
- Stern, E.Y., Kalynchuk, L.E., 2010. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 777–790.
- Stevenson, J.R., Schroeder, J.P., Nixon, K., Besheer, J., Crews, F.T., Hodge, C.W., 2009. Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 1209–1222.
- Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F.A., Gass, P., 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 29, 2007–2017.
- Tissir, F., Goffinet, A.M., 2003. Reelin and brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 496–505.
- Tueting, P., Costa, E., Dwivedi, Y., Guidotti, A., Impagnatiello, F., Manev, R., Pesold, C., 1999. The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse. *NeuroReport* 10, 1329–1334.
- Tueting, P., Doueiri, M.S., Guidotti, A., Davis, J.M., Costa, E., 2006. Reelin down-regulation in mice and psychosis endophenotypes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 1065–1077.
- Vollmayr, B., Simonis, C., Weber, S., Gass, P., Henn, F., 2003. Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with the development of learned helplessness. *Biol. Psychiatry* 54, 1035–1040.
- Wedenoja, J., Tuulio-Henriksson, A., Suvisaari, J., Loukola, A., Paunio, T., Partonen, T., Varilo, T., Longqvist, J., Peltonen, L., 2010. Replication of association between working memory and reelin, a potential modifier gene in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 67, 983–991.
- Weeber, E.J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J.M., Forster, E., Sweatt, J.D., Herz, J., 2002. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol. Chem.* 277, 39944–39952.
- Weiss, K.H., Johansen, C., Tiesch, A., Herz, J., Deller, T., Frotscher, M., Forster, E., 2003. Malformation of the radial glia scaffold in the dentate gyrus of reeler mice, scramble mice, and ApoER2/VLDLR-deficient mice. *J. Comp. Neurol.* 460, 56–65.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 23, 482–497.
- Wong, E.Y., Herbert, J., 2004. The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors’ survival in the adult hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2491–2498.
- Wong, E.Y., Herbert, J., 2006. Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* 137, 83–92.
- Zhao, S., Chai, X., Forster, E., Frotscher, M., 2004. Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development* 131, 5117–5125.
- Zhao, S., Chai, X., Bock, H.H., Brunne, B., Forster, E., Frotscher, M., 2006. Rescue of the reeler phenotype in the dentate gyrus by wild-type coculture is mediated by lipoprotein receptors for reelin and disabled 1. *J. Comp. Neurol.* 495, 1–9.
- Zhao, Y., Ma, R., Shen, J., Su, H., Xing, D., Du, L., 2008. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur. J. Pharmacol.* 581, 113–120.
- Zhao, Y., Xie, W., Dai, J., Wang, Z., Huang, Y., 2009. The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice. *Brain Res.* 1261, 82–90.

Tira cómica para mentes inquietas

(os HRM son máis vulnerables que os WTM fronte ao estrés.....)

por Rooster

